

Université de Sherbrooke

**Utilisation de vecteurs protéiques pour l'imagerie et le traitement
de tumeurs**

par

Romain Alarie

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-85006-X

Canada

Table des matières

Liste des illustrations.....	i
Liste des abréviations.....	vi
Résumé.....	viii
Introduction.....	1
Matériel et méthodes.....	11
1. Matériel et techniques générales.....	11
1.1. Conjugués protéine-ZnPc.....	11
1.2. Produits marqués.....	11
1.3. Études animales.....	12
2. Synthèse des conjugués protéine-ZnPc.....	12
2.1. ZnPc-(COOH) ₄	12
2.2. BSA-ZnPc.....	13
2.3. PlgG-ZnPc.....	14
2.4. PlgG-dextran-ZnPc.....	14
2.4.1. Préparation du ZnPc-amine.....	14
2.4.2. Préparation du dextran-amine-ZnPc.....	15
2.4.3. Préparation du dextran-amine-ZnPc lié aux PlgG.....	15
2.5. PlgG-polylysine-ZnPc.....	15
2.5.1. Préparation de polylysine-ZnPc.....	16
2.5.2. Préparation de PlgG-polylysine-ZnPc.....	16
3. Obtention des tumeurs chez les animaux.....	16

3.1. Tumeurs EMT-6.....	17
3.2. Tumeurs MAC.....	17
4. Marquage des protéines et des conjugués protéine-ZnPc.....	17
4.1. Marquage à l'iode.....	17
4.2. Marquage au technetium.....	19
5. Injection des produits marqués.....	19
6. Dissection des souris BALB/c.....	20
7. Scintigraphies gamma.....	20
7.1. Souris BALB/c.....	21
7.2. Rats Fischer.....	21
8. Traitement statistique des résultats.....	21
Résultats.....	19
1. Biodistribution des protéines natives marquées à l'iode-125.....	22
2. Biodistribution des conjugués protéine-ZnPc marqués à l'iode-125.....	27
3. Cinétique d'élimination des produits marqués.....	37
3.1. Protéines natives marquées à l'iode-125.....	37
3.2. Conjugés protéine-ZnPc marqués à l'iode-125.....	40
4. Scintigraphies gamma.....	42
4.1. [¹³¹ I]-PIgG et [¹³¹ I]-BSA.....	42
4.2. [⁶⁷ Ga]-citrate, [^{99m} Tc]-PIgG, et [¹³¹ I]-BSA.....	42
Discussion.....	48
1. Sélectivité tumorale.....	48
1.1. Métabolisme tumoral.....	48
1.2. Physiologie tumorale.....	50
1.2.1. L'espace interstitiel tumoral.....	50

1.2.2. La vasculature tumorale.....	52
1.3. L'environnement cellulaire tumoral.....	53
2. Biodistribution de [125 I]-BSA, [125 I]-PIgG, et [125 I]-LDL.....	54
2.1. [125 I]-BSA.....	55
2.2. [125 I]-PIgG.....	56
2.3. [125 I]-LDL.....	58
3. Cinétique d'élimination de [125 I]-BSA, [125 I]-PIgG, et [125 I]-LDL.....	59
4. Cinétique d'élimination des conjugués [125 I]-protéine-ZnPc.....	61
5. Scintigraphies gamma.....	65
6. Marquage des protéines et stabilité des produits marqués <i>in vivo</i>	67
Conclusion.....	69
Remerciements.....	71
Bibliographie.....	73
Annexe.....	91

Liste des illustrations

Tableaux:

1. Nombre de ZnPc liés à l'albumine (BSA) et aux PlgG.....	16
2. Conditions de marquage à l' ¹²⁵ I des protéines et des conjugués protéine-ZnPc utilisés pour les biodistributions dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	18
3. Conditions de marquage à l' ¹³¹ I des protéines utilisées pour l'imagerie gamma de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6 et de rats Fischer portant des tumeurs MAC.....	18
4. Paramètres d'injection des produits marqués à l' ¹²⁵ I, pour biodistribution dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	19
5. Paramètres d'injection des produits marqués à l' ¹³¹ I, au ⁶⁷ Ga, et au ^{99m} Tc, pour imagerie gamma de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6 et de rats Fischer portant des tumeurs MAC.....	20
6. Biodistribution de [¹²⁵ I]-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	22
7. Activité de [¹²⁵ I]-BSA dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	23

8. Biodistribution de [¹²⁵I]-PIgG dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	24
9. Activité de [¹²⁵I]-PIgG dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	25
10. Biodistribution de [¹²⁵I]-LDL dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	26
11. Activité de [¹²⁵I]-LDL dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	26
12. Biodistribution de [¹²⁵I]-BSA-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	27
13. Activité de [¹²⁵I]-BSA-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	28
14. Biodistribution de [¹²⁵I]-PIgG-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	29
15. Activité de [¹²⁵I]-PIgG-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	30
16. Biodistribution de [¹²⁵I]-PIgG-d-ZnPc dans des souris BALB/c	

portant des tumeurs EMT-6.....	31
17. Activité de [¹²⁵ I]-PIgG-d-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	32
18. Biodistribution de [¹²⁵ I]-PIgG-pl-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	33
19. Activité de [¹²⁵ I]-PIgG-pl-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	34
20. Demi-vie des protéines marquées à l' ¹²⁵ I, dans des tissus de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	38
21. Demi-vie des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ¹²⁵ I, dans des tissus de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	38
22. Activité des protéines marquées à l' ¹²⁵ I, dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	40
23. Activité des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ¹²⁵ I, dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	41

Figures:

1. Structure chimique des phtalocyanines.....	5
---	---

2. Schéma général de la thérapie photodynamique des tumeurs.....	6
3. Activité des protéines et des conjugués protéine-ZnPc marqués à I^{125}, dans le sang, la tumeur, les reins, le foie, et la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	35-36
4. Activité des protéines et des conjugués protéine-ZnPc marqués à I^{125}, dans la tumeur EMT-6 de souris BALB/c, par rapport à leur activité dans des tissus non-tumoraux.....	36
5. Scintigraphies gamma des $[^{131}I]$-PlgG et de $[^{131}I]$-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 3 heures après injection des protéines marquées.....	43
6. Scintigraphies gamma des $[^{131}I]$-PlgG et de $[^{131}I]$-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 24 heures après injection des protéines marquées.....	44
7. Scintigraphies gamma des $[^{131}I]$-PlgG et de $[^{131}I]$-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 168 heures après injection des protéines marquées.....	45
8. Scintigraphies gamma du $[^{67}Ga]$-citrate et des $[^{99m}Tc]$-PlgG dans un rat Fischer portant une tumeur MAC, 24 heures après injection des produits marqués.....	46
9. Scintigraphies gamma de $[^{131}I]$-BSA et des $[^{99m}Tc]$-PlgG dans un rat Fischer portant une tumeur MAC, 24 heures après injection des produits marqués.....	47

10. Calcul de la demi-vie de [125I]-BSA dans le sang de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.....	89
---	-----------

Liste des abréviations

AcM : anticorps monoclonaux

act. : activité

BSA : bovine serum albumin (albumine sérique bovine)

d : dextran

DHE : dihematoporphyrin ether/ester (éther/ester de dihématoporphyrine)

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDAC : 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide

EMT-6 : embryonic mammary tumor (tumeur mammaire embryonnaire)

ÉT : écart-type de la moyenne

Fc : région constante des immunoglobulines

HPD : hematoporphyrin derivative (dérivé d'hématoporphyrine)

IgG : immunoglobulines gamma

kD : kilodalton

LDL : low density lipoproteins (lipoprotéines de faible densité)

MAC : murine adenocarcinoma of the colon (adénocarcinome murin du colon)

NHSS : N-hydroxysulfosuccinimide

PBS : phosphate buffered saline (solution saline tamponnée avec du phosphate;
(0,15 M NaCl, 0,01 M phosphate, pH 7,4)

PDT : photodynamic therapy (thérapie photodynamique)

PigG : immunoglobulines gamma polyclonales

pl : polylysine

% DI/g : pourcentage de la dose injectée, par gramme de tissu

t : temps

$t_{1/2}$: demi-vie

t_2 : temps de doublement de l'activité

^{99m}Tc : technetium-99m

tnt : tissus non-tumoraux

tpm : tours par minute

ZnPc : phtalocyanine de zinc

Résumé

Université de Sherbrooke

Utilisation de vecteurs protéiques pour l'imagerie et le traitement de tumeurs

par

Romain Alarie

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

La sélectivité envers leur tissu cible est la caractéristique première que doivent posséder les agents utilisés pour la détection ou le traitement de tumeurs solides. Nous avons évalué la capacité de trois types de protéines (immunoglobulines G polyclonales (PlgG), albumine, et lipoprotéines de faible densité (LDL)) à détecter *in vivo* des tumeurs inoculées à des souris et à des rats (tumeur EMT-6/souris BALB/c, tumeur MAC/rat Fischer). Les PlgG ne sont pas dirigés contre un antigène spécifique des cellules tumorales que nous avons utilisées. Nous avons également

employé les PlgG et l'albumine comme porteur d'une phthalocyanine de zinc (ZnPc), photosensibilisateur de deuxième génération très prometteur dans le cadre de la thérapie photodynamique de certaines tumeurs. Le ZnPc était lié de façon covalente aux protéines, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un polymère biologique (dextran ou polylysine). Les différents produits, marqués à l'iode-125, à l'iode-131, ou au technetium-99m, ont été injectés dans la veine caudale des animaux. A différents temps après injection, la distribution de la radioactivité a été évaluée par scintigraphie gamma des animaux entiers ou par dissection des animaux et comptage de l'activité dans différents tissus. Les pourcentages maximaux des doses injectées des protéines marquées, par gramme de tumeur ($\% \text{ DI/g}_{\text{tumeur}}$) sont d'environ: 23 pour les PlgG, 9 pour l'albumine, et 5 pour les LDL. Les rapports entre l'activité dans la tumeur et l'activité moyenne dans les tissus non-tumoraux atteignent: 10 pour les PlgG, 5 pour l'albumine, et 3 pour les LDL. Dans le cas des photoconjugués, les $\% \text{ DI/g}_{\text{tumeur}}$ maximaux sont d'environ: 5 pour l'albumine-ZnPc et les PlgG-ZnPc, et 3 pour les PlgG-dextran-ZnPc et les PlgG-polylysine-ZnPc. Ces résultats montrent la sélectivité tumorale des PlgG et suggèrent que ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'approche photodynamique du traitement de tumeurs.

Introduction

Le grand défi et le grand rêve de l'oncologie diagnostique sont de trouver un agent permettant la détection sans équivoque du plus grand nombre de types de tumeurs au stade le plus précoce de leur développement. Depuis la description par Paul Ehrlich, en 1898, de molécules qui pourraient être dirigées de façon spécifique vers certains organes ou tissus, ces fameux "projectiles magiques" (Ehrlich, 1906), plusieurs étapes ont été franchies pour atteindre cet objectif d'une importance primordiale en cancérologie.

Tout d'abord, l'avènement de la médecine nucléaire et des possibilités qu'elle offre de localiser, à l'aide de détecteurs extra-corporels, des substances radioactives que l'on injecte au patient, ouvre la voie à une panoplie de nouvelles méthodes diagnostiques. Parallèlement, des études montrent les propriétés qu'ont certaines molécules, comme le citrate de ^{67}Ga , de se concentrer sur certains sites tumoraux (Edward et Hayes, 1969). Depuis, plusieurs autres de ces petites molécules marquées (^{111}In -EDTA-bléomycine, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sn-N-pyridoxyl-5-méthyl-tryptophane, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimercaptosuccinate) ont été étudiées, dans le but d'évaluer leur potentiel de localisation tumorale (Yokoyama *et al.*, 1985; Fujii, *et al.*, 1990; Abrams, 1991).

Autre développement important, la mise au point de la technologie des hybridomes permet de produire en grandes quantités des anticorps monoclonaux (AcM) très purs (Kohler et Milstein, 1975). Ces AcM sont dirigés contre des

antigènes synthétisés par certaines cellules tumorales (marqueurs tumoraux), souvent des protéines qui jouent le rôle de facteurs de croissance lors du développement normal d'un organisme au stade fœtal (e.g. antigène carcinoembryonnaire, alpha-fœtoprotéine), et qui ne sont plus exprimées, ou exprimées en quantités réduites, à l'âge adulte (Gold et Freedman, 1965; Abelev, 1971). Si les AcM radioactifs semblent incarner, dans le cadre d'études animales, le vecteur idéal de diagnostic tumoral, les études cliniques sur les humains sont, pour la plupart, décevantes, et ce, pour trois raisons principales: 1) leur fréquent manque de sensibilité et de spécificité, surtout au stade précoce du développement d'un cancer, ou si le patient est atteint d'une autre pathologie dans la région où l'on tente de dépister une tumeur (Cullen *et al.*, 1976; Fleischman *et al.*, 1983), 2) les faibles concentrations que l'on retrouve généralement sur les sites tumoraux, limitant leur capacité de détection de petites tumeurs (< 1 cm) (Sands, 1990), et 3) les liaisons de l'anticorps avec des tissus non-tumoraux, étant donné que l'on n'a pas encore identifié, de façon incontestable, un marqueur qui ne serait exprimé que par des cellules cancéreuses (l'antigène carcinoembryonnaire, par exemple, se retrouve à la surface de plusieurs surfaces épithéliales) (Bradwell, 1985).

Nous avons, pour notre part, tenté de déterminer le potentiel de trois types de protéines (immunoglobulines gamma polyclonales, albumine, LDL), dont on a montré qu'elles ont tendance à s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux, comme agents de détection et de visualisation de tumeurs mammaires et du colon implantées chez des souris ou des rats; ces trois protéines. Les modèles tumoraux que nous avons employés sont des standards pour le genre

d'expériences effectuées dans nos laboratoires (biodistributions de produits marqués, imagerie). Les tumeurs mammaires utilisées pour les expériences avec les souris étaient des EMT-6 (adénocarcinome mammaire embryonnaire), tumeurs à croissance rapide, bien vascularisées, bien adaptées à des recherches ayant pour but la concentration d'une molécule sur un site tumoral (Greer *et al.*, 1992; Teicher *et al.*, 1991). Les tumeurs utilisées chez les rats étaient des MAC (adénocarcinome du colon), présentant sensiblement les mêmes caractéristiques que les EMT-6 (Quinn *et al.*, 1992), leur croissance étant cependant plus lente, ce qui les rend plus adaptées à une utilisation sur des rats, les tumeurs EMT-6 nécrosant trop rapidement avant d'atteindre une taille suffisante pour les dimensions de l'animal.

Les immunoglobulines gamma (IgG) sont des protéines d'environ 150 kD, dont le rôle premier est de se fixer aux composantes antigéniques d'un agent étranger à un organisme. Les IgG sont synthétisées et sécrétées par les lymphocytes B, qui sont formés dans la moëlle osseuse. Chaque IgG est extrêmement spécifique et n'est dirigée que contre un seul antigène. Les IgG utilisées dans nos expériences sont polyclonales et ne sont pas dirigées contre un antigène propre aux cellules tumorales que nous avons injectées à nos animaux. C'est plutôt la partie Fc (partie constante) de l'anticorps qui semble responsable de l'accumulation d'IgG polyclonales (PIgG) dans les régions d'inflammation et d'infection (Fischman *et al.*, 1990), qui contiennent plusieurs types de cellules susceptibles de fixer des IgG (macrophages, mastocytes). Il est possible que la réponse immunitaire déclenchée par la présence d'une tumeur chez un animal puisse créer, dans la région tumorale, un milieu similaire à celui que l'on retrouve dans la région d'une

infection ou d'une inflammation. Quant à l'albumine, c'est une protéine d'à peu près 60 kD, dont on ne connaît aucun récepteur cellulaire; elle constitue près de 50 % de la masse protéique plasmatique, et sert surtout à maintenir constante la pression hydrostatique vasculaire. Elle servira de protéine contrôle.

La présence d'une tumeur peut toutefois modifier la distribution des protéines en général, et ce pour plusieurs raisons. Des études ont montré qu'il existait des différences métaboliques entre cellules normales et cellules tumorales: 1) l'utilisation de composés azotés par les cellules cancéreuses serait anormalement élevée (l'hypothèse du "piège à azote") (Mider, 1951), et 2) le taux d'internalisation de LDL par certains types de cellules tumorales serait accentué (Vitols *et al.*, 1984; Hynds *et al.*, 1984). En plus, l'environnement et la physiologie des tumeurs diffèrent de ceux des tissus normaux: 1) les particularités de la microvasculature tumorale, hyperperméable aux macromolécules, favoriseraient l'accumulation de ces macromolécules dans la région des tumeurs (Gerlowski et Jain, 1986; Jain, 1988), et 2) le liquide interstitiel tumoral contiendrait des quantités élevées de cellules du système immunitaire (lymphocytes T, monocytes, macrophages) pouvant fixer des immunoglobulines (Witz, 1973; Allen et Hogg, 1985). Ce sont tous ces facteurs qui ont formé la base de nos expériences.

Nous avons également étudié la possibilité d'utiliser les immunoglobulines gamma polyclonales et l'albumine, qui servira encore une fois de contrôle protéique, comme transporteurs d'une phtalocyanine, de manière à augmenter sa concentration sur les sites tumoraux. Pour ce faire, nous avons lié, de façon covalente, la phtalocyanine aux deux protéines, soit directement, soit par

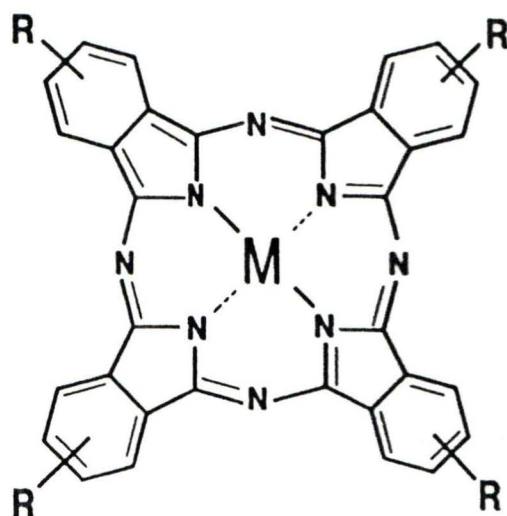


FIGURE 1. Structure des phthalocyanines. R: groupement périphérique, M: métal.

l'intermédiaire d'une chaîne polymérique (dextran ou polylysine).

Les phthalocyanines ressemblent aux porphyrines, molécules dont la structure comporte un macrocycle leur permettant d'absorber fortement la lumière visible à certaines longueurs d'onde (Figure 1). Après irradiation par la lumière à une longueur d'onde adéquate, la phthalocyanine devient excitée et, dans l'environnement tumoral, peut transférer son énergie à d'autres espèces chimiques, principalement l'oxygène moléculaire, qui deviennent excitées à leur tour et peuvent détruire la tumeur en attaquant les vaisseaux sanguins qui l'irriguent (effet indirect) ou des structures (mitochondrie, membrane cytoplasmique) essentielles à la survie des cellules tumorales (effet direct) (Foote, 1976; Henderson *et al.*, 1984; Girotti, 1990). C'est le principe de ce qu'on appelle la thérapie photodynamique (PDT), où l'on injecte à un patient un photosensibilisateur et, après un temps d'attente plus ou moins long pour permettre au produit de s'accumuler dans la région tumorale, on irradie la tumeur avec une puissante

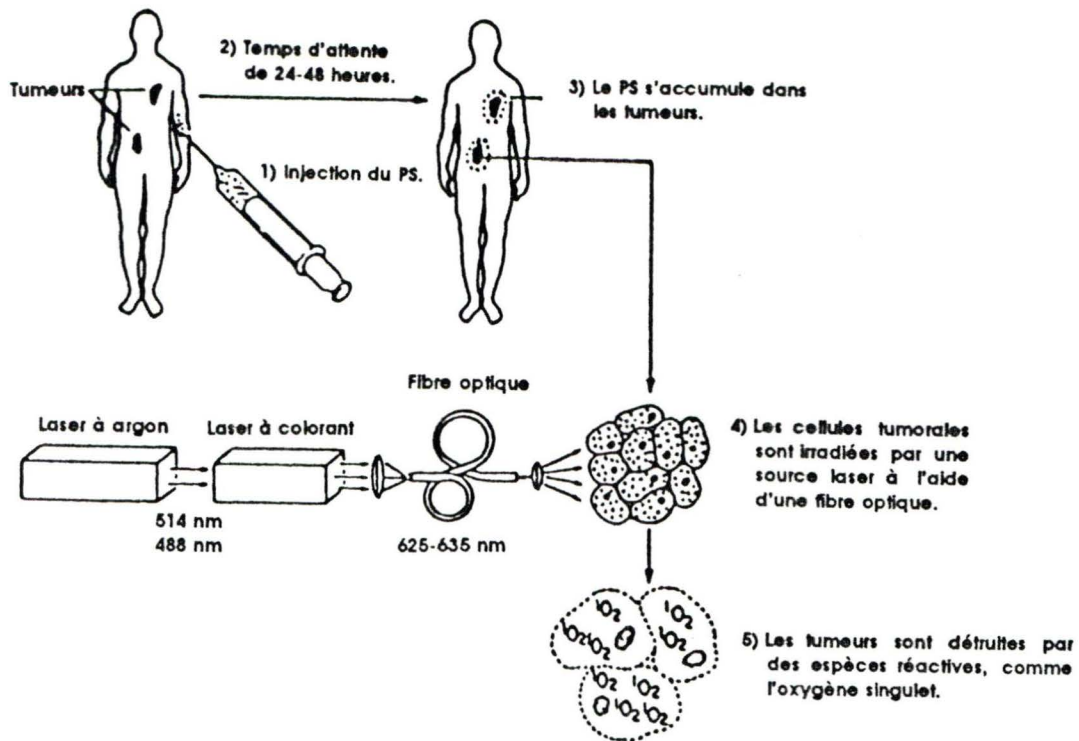


FIGURE 2. Schéma général de la thérapie photodynamique des tumeurs. PS: photosensibilisateur. (Adapté de: Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy of cancer, Berns, M.W., éd.).

source lumineuse pour activer le photosensibilisateur (Figure 2).

Le photosensibilisateur le plus étudié, dans le cadre de la PDT du cancer, est le HPD (dérivé d'hématoporphyrine, qui est commercialisé sous le nom de Photofrin II), composé d'un mélange de plusieurs produits de type porphyrine (Kessel, 1984) dont des DHE (éthers ou esters de dihématoporphyrine), qui constitueraient vraisemblablement sa fraction active antitumorale (Dougherty, 1984). Même si le HPD s'est avéré efficace pour le traitement de plusieurs types de tumeurs chez l'humain (Dougherty *et al.*, 1985), ils présentent de sérieux inconvénients (Rosenthal et Ben-Hur, 1989): 1) c'est un mélange de porphyrines qui n'est pas défini avec précision et dont la composition est probablement variable.

De plus, il n'y a pas unanimité absolue quant à la nature de la fraction active du mélange (Berenbaum *et al.*, 1982; Dougherty *et al.*, 1984), 2) sa sélectivité tumorale est relativement faible (Gomer et Dougherty, 1979), 3) pour assurer la pénétration d'une quantité adéquate de lumière dans une tumeur de plus de 2-3 mm d'épaisseur, il est nécessaire d'utiliser une longueur d'onde d'illumination dans la partie du spectre visible correspondant au rouge, et le HPD n'a qu'un faible pic d'absorption dans cette région, à 630 nm, et 4) sa capacité d'absorption à presque toutes les longueurs d'onde du spectre visible et son accumulation au niveau de la peau provoquent, après injection chez le patient, une photosensibilité cutanée. Ces problèmes associés au HPD ont encouragé le développement d'autres types de photosensibilisateurs.

Les phtalocyanines sont parmi les plus prometteurs et les plus étudiés des photosensibilisateurs de deuxième génération. Elles offrent plusieurs avantages par rapport au HPD: 1) elles possèdent un fort pic d'absorption de la lumière visible dans le rouge, à 675 nm, région dans laquelle les photons ont un meilleur pouvoir de pénétration dans les tissus qu'à 630 nm (Wilson *et al.*; 1990), 2) ce sont des composés plus purs que le Photofrin II, et 3) elles ne provoquent pas une photosensibilité cutanée aussi élevée.

Les propriétés antitumorales des phtalocyanines, surtout ceux de zinc et d'aluminium, sont maintenant bien établies *in vitro* et dans des modèles animaux (Glassberg *et al.*, 1990; Brasseur *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1988; Tralau *et al.*, 1987). Les phtalocyanines montrent également, dans des modèles animaux, une sélectivité tumorale (Barr *et al.*, 1990; Rousseau *et al.*, 1990; Kessel *et al.*, 1987). Par

contre, les phtalocyanines sont affligées d'une caractéristique très embêtante pour les études biologiques: elles sont insolubles dans l'eau, à moins de leur greffer des groupements chimiques augmentant leur hydrophilicité (présentement, ce sont surtout des groupements SO_3^- qui sont utilisés, mais les effets d'autres substituants sur la phototoxicité des phtalocyanines font présentement l'objet d'investigations) (Paquette *et al.*, 1991; Rihter *et al.*, 1992).

Une autre approche pour aider non seulement à la solubilisation des phtalocyanines dans l'eau, mais également pour augmenter leur spécificité tumorale, est fondée sur l'emploi de différents porteurs auxquels est conjugué le photosensibilisateur. Jusqu'à maintenant, les phtalocyanines et les porphyrines ont été injectées aux animaux de laboratoires surtout sous leur forme native (à laquelle ont été ajoutés des groupements chimiques permettant la solubilisation des photosensibilisateurs en solution aqueuse). Des méthodes d'analyse exploitant les propriétés photochimiques des phtalocyanines ont été développées pour leur détection *in vivo* (van Leengoed *et al.*, 1991), à des fins diagnostiques, et pour déterminer avec plus de précision les sites et les modes d'action de plusieurs types de photosensibilisateurs (Chan *et al.*, 1989; Kessel, 1991; Kessel *et al.*, 1991; Kessel et Schulz, 1990). Lin *et al.* (1984) ont, à l'aide d'un système de fibres optiques, mis au point une technique de détection de cancers de la vessie; Aizawa *et al.* (1984) et Balchum *et al.* (1984) ont, eux aussi en utilisant des systèmes de fibres optiques, réussi à détecter des cancers des bronches à des stades assez précoces de leur développement. Cependant, l'emploi de porteur pourrait éventuellement permettre d'augmenter non seulement les quantités de photosensibilisateurs qui se retrouvent sur les sites tumoraux, mais également leur spécificité et leur

sélectivité. Des méthodes ont été perfectionnées pour lier des porphyrines à des AcM (Mew *et al.*, 1983; Roberts *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 1990) et les encapsuler dans des liposomes (Jori *et al.*, 1986), afin d'améliorer le ciblage sélectif des tissus tumoraux. Car les produits comme le HPD, quand ils sont injectés à un patient, ont tendance à s'accumuler dans la peau et à y rester longtemps, imposant au sujet un séjour prolongé hors de la lumière solaire pour lui éviter des effets épidermiques néfastes, comme des ampoules et de l'œdème.

Dans le cas des phtalocyanines, très peu de recherches ont été faites pour les intégrer à des porteurs. Ils ont été incorporés dans des LDL et des liposomes (Reddi *et al.*, 1990), dans des nanocapsules et des nanoparticules de cyanoacrylate (Labib *et al.*, 1991), et dans des liposomes auxquels sont liés des AcM (Morgan *et al.*, 1989). Dans le cas des expériences de Reddi *et al.* (1990), les LDL ont permis, par rapport aux liposomes, une concentration plus élevée de phtalocyanine dans la tumeur étudiée. Également, la sélectivité tumorale du photosensibilisateur est supérieure dans le cas des LDL (les rapports tumeur/foie et tumeur/muscle atteignent 1,04 et 3,84 pour le complexe ZnPc-liposome, et 2,27 et 5,71 pour le complexe ZnPc-LDL). Par contre, il y a une redistribution rapide du ZnPc sur d'autres composantes sériques, diminuant les quantités de phtalocyanine susceptible d'être internalisée par la tumeur. Les travaux de Labib *et al.* (1991) ont montré qu'il est possible d'obtenir des pourcentages élevés d'encapsulation de phtalocyanines et de naphthalocyanines dans des nanosphères polymériques. Le problème majeur associé à cette approche est la forte captation des particules de polymère par les cellules du système hépatique, diminuant énormément l'utilité de cette approche pour le traitement de tumeurs situées dans un autre organe

que le foie. Le couplage d'un AcM tumoral à des liposomes, tel que l'ont effectué Morgan *et al.* (1989), pourrait diminuer considérablement la captation non tumorale du phtalocyanine.

Les porteurs que nous avons employés ont l'avantage d'être des protéines d'utilisation courante, et peu coûteuses. Il s'agira maintenant de déterminer dans quelle mesure une phtalocyanine conjuguée à de l'albumine ou à des PlgG peut provoquer, après photoirradiation, la nécrose d'une masse tumorale *in vivo*.

Matériel et méthodes

1. Matériel et techniques générales:

1.1. Conjugués protéine-ZnPc: les solvants et les réactifs ont été achetés de Sigma, Aldrich, ou Fisher. L'albumine bovine provient de chez Sigma. Les immunoglobulines sont des Sandoglobulines (Sandoz). Les chromatographies sur couche mince (TLC) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Brinkmann de 0,25 mm d'épaisseur recouvertes d'un indicateur fluorescent (UV 254 nm). Les mélanges réactionnels bruts ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice avec des grosseurs de mailles allant de 60 à 200 (Pharmacia). Les chromatographies liquides haute performance (HPLC) ont été faites sur une colonne de C-18 (Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 25 cm x 0,94 cm) de Chromatographic Specialties Inc. (Montréal), éluant à 2 ml/min avec un gradient linéaire (55 min) allant de 0 % à 100 % méthanol dans un tampon acétate 10 mM, pH 5. La concentration des phtalocyanines était déterminée par le calcul de l'absorbance à 670 nm. Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Varian 2200. Un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5890 a été utilisé pour obtenir les spectres de masse par les méthodes d'ionisation et de bombardement rapide d'atome (FAB). Les analyses électrophorétiques ont été faites avec des gels d'agarose 1 %, pendant 2 heures, dans un tampon barbital, pH 8,5, avec une tension de 20 V et un courant de 100 mA.

1.2.: Produits marqués: Les protéines utilisées pour les biodistributions et les scin-

tigraphies gamma, et qui ont été marquées à l'iode, proviennent de chez Sigma (albumine bovine et LDL), ou de chez Sandoz (immunoglobulines G). Les radioisotopes d'iode ont été obtenus d'Amersham. L'Iodogen employé lors de l'étape du marquage à l'iode est de Pierce. Les colonnes employées lors de la filtration sur gel étaient composées de Bio-Gel P-30 (Bio-Rad) ou de Sephadex G-10 (Pharmacia). Les immunoglobulines G pré-réduites proviennent d'un kit (Rho-Med Inc.) et ont été marquées avec du ^{99m}Tc provenant d'un générateur clinique ^{99}Mo - ^{99m}Tc (DuPont). Le citrate de ^{67}Ga a été acheté de DuPont.

1.3.: Études animales: les souris BALB/c et les rats Fischer viennent des laboratoires Charles Rivers. Les animaux étaient anesthésiés en leur faisant respirer de l'éther éthylique (Fisher) ou en leur injectant de façon intramusculaire un mélange de kétamine (Rogarsetic, Rogar/STB Inc.) et de rompun (xylazine). La radioactivité dans les tissus après dissection des souris était détectée par un compteur gamma (Compugamma 1282, LKB Wallac). Les images scintigraphiques ont été obtenues avec une caméra gamma Pho-V contrôlée par un système de Searle Radiographics.

2. Synthèse des conjugués protéines-ZnPc:

Note : la synthèse de tous les conjugués protéine-ZnPc a été effectuée par René Ouellet, Ph.D., chimiste dans le laboratoire du Dr. Johan E. van Lier.

2.1. ZnPc-(COOH)₄: (d'après Martin Negri *et al.*, 1991, et Orihashi *et al.*, 1987). Un mélange d'acétate de zinc (1g, 4,6 mmoles), d'anhydride trimélique (3,22 g, 16,8

mmoles), d'urée (20 g), de chlorure d'ammonium (0,75 g), de molybdate d'ammonium (0,25 g), et de nitrobenzène (25 ml), a été chauffé à 200°C pendant 4 heures, puis 50 ml d'acide chlorhydrique 1 N ont été ajoutés, et la solution a été chauffée pendant 1 heure à 100°C. Le produit a été filtré, puis lavé à l'eau et au méthanol, jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore, donnant la forme tétraamide du ZnPc. Le produit brut a été chauffé à la température d'ébullition pendant 5 heures dans 100 ml de NaOH 0,1 M. Il a ensuite été filtré, précipité avec HCl 10 %, centrifugé, et le processus répété 2 fois, avant que le produit final (très soluble dans NaOH 0,1 M) fut séché au four. La pureté du produit a alors été vérifiée et confirmée par HPLC.

2.2. BSA-ZnPc: ont été mélangés, dans 1 ml de PBS, du ZnPc-(acide hémisuccinique)₄ (10 mg dissous dans 0,2 ml d'une solution de phosphate, pH 7,4, et 0,1 ml de DMF), de l'EDAC-HCl (2,8 mg, 0,15 mmole, 50 équivalents), et de l'albumine bovine (BSA, 20 mg, 0,3 μ mole, 1 équivalent). Le mélange a été agité à 25°C pendant 16 heures. La réaction terminée, une nouvelle tache bleue, détectable à l'oeil nu, et correspondant à au complexe BSA-ZnPc, a pu être observée lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose (tampon carbonate 0,05 M, pH 7). Les Pc possèdent un maximum d'absorbance à environ 670 nm, et prennent donc une couleur bleue en lumière blanche. L'électrophorèse sur gel d'agarose présente l'avantage d'être très rapide, et assez précise pour la détection de nouveaux produits formés lors des réactions chimiques. Après dialyse dans du PBS, la solution a été passée sur une colonne de Sephadex G-25 et les fractions correspondant à la première bande bleue ont été recueillies. Quand la même réaction a été faite sans albumine, une seule tache bleue, correspondant au

produit de départ, a été détectée par électrophorèse.

2.3. PlgG-ZnPc: du $\text{ZnPc}-(\text{COOH})_4$ (1 mg, 1 μmole , dissous dans 1 ml de DMF) a été ajouté à 1 ml d'eau contenant de l'EDAC (1 mg, 5,2 μmoles). La solution a été agitée à 25°C pendant 1 heure et 2 ml d'eau y ont été ajoutés. Des PlgG (1 mg, 6,6 nmoles, dissous dans 1 ml d'eau) ont alors été introduits dans le mélange et le pH a été maintenu à 6-7 pendant 5 heures. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 20 μl d'éthanolamine (dans 200 μl d'eau). Le mélange a reposé une nuit à température ambiante avant d'être dialysé pendant une journée dans du PBS. Il a ensuite été passé sur une colonne de Sephadex G-25 avec du PBS comme éluant. Le $\text{ZnPc}-(\text{COOH})_4$ n'ayant pas réagi est resté au sommet de la colonne. La solution a été concentrée à 1 ml, en la soumettant à un jet d'azote, accélérant ainsi l'évaporation du solvant. La réaction de couplage a été répétée avec une quantité supplémentaire de $\text{ZnPc}-(\text{COOH})_4$ activé, de manière à augmenter le nombre de ZnPc liées à l'albumine. La solution finale a été concentrée à 0,9 ml.

2.4. PlgG-Dextran-ZnPc:

2.4.1. Préparation du ZnPc-amine: à une solution de $\text{ZnPc}-(\text{acide hémisuccinique})_4$ (12 mg, 12 μmoles , dissous dans 12 ml de DMF) ont été ajoutés 0,15 ml de triéthylamine (15 μmoles , 10 mg/ml de DMF) et 0,15 ml de chloroformate d'éthyle (15 μmoles , 10 mg/ml de DMF). La solution a été agitée 30 minutes à 25°C et puis a été ajouté 0,15 ml d'éthylène diamine (25 μmoles , 10 mg/ml de DMF). Comme un précipité s'est formé, une plus grande quantité de DMF a été ajoutée pour obtenir

une solution claire. Le mélange a été gardé à 25°C pendant 16 heures, le solvant évaporé, et le produit solubilisé dans 15 ml de PBS.

2.4.2. Préparation du dextran-amine-ZnPc: une solution de dextran (M.W. 9000, 10 mg, 1,1 μ mole) et périodate de sodium (10 mg, 45 μ moles), dissous dans 5 ml de PBS, a reposé une heure à 0°C, puis a été passée sur une colonne de Sephadex G-25 avec de l'eau comme éluant. 3 fractions de 5 ml furent recueillies et lyophilisées. De l'éthylène diamine (0,17 mg, 2,8 μ moles, 5 équivalents) et du ZnPc-(hémi-1-amine)₄ (12 μ moles, 22 équivalents, dans 15 ml de PBS) ont été ajoutés à 5 mg (0,56 μ mole) de dextran oxydé dissous dans 1 ml de PBS. La solution a été agitée à 4°C pendant 16 heures. Alors fut ajouté du cyanoborohydrure de sodium (1,7 mg, 27 μ moles), et le mélange a été agité 1 h à 4°C pour réduire les liaisons imines. S'ensuivit une dialyse de la solution dans de l'eau, pour donner 12 μ moles de dextran-amine-ZnPc dans 23 ml de PBS. Il y a cependant aggrégation du produit dans moins de 70% DMF.

2.4.3. Préparation du dextran-ZnPc lié aux PlgG: un mélange de PlgG (1 mg, 6,6 nmoles, dissous dans 0,1 ml de PBS) et de périodate de sodium (36 μ g, 30 équivalents, dissous dans 36 μ l d'eau) a reposé 1 heure à 4°C dans l'obscurité, et a été dialysé dans du PBS, pour donner 1 mg de PlgG oxydés dans 0,4 ml de PBS. Cette solution a été ajoutée à 0,4 ml de dextran-amine-ZnPc (12 μ moles/23 ml de PBS, 30 équivalents) et 0,2 ml de DMF (20 %), pour donner une solution claire, qui est restée 16 heures à 4°C. Du cyanoborohydrure de sodium a été ajouté et la solution a été dialysée dans du PBS.

2.5. PlgG-polylysine-ZnPc:

2.5.1. Préparation de polylysine-ZnPc: une mixture de ZnPc-(COOH)₄ (2 mg/2 ml de DMF, 2 µmoles, 100 équivalents), d'EDAC (1mg/1 ml de DMF, 5,2 µmoles, 200 équivalents), et de NHS (1 mg/1 ml de DMSO, 8,7 µmoles, >300 équivalents) a été agitée 5 minutes à 25°C. De la polylysine (M.W. 40 000, 1 mg/1 ml de DMSO, 26 nmoles, 1 équivalents) et de la pyridine (0,5 ml) furent alors ajoutées et le tout fut chauffé 2 heures à 40°C. La solution fut passée sur une colonne de Sephadex G-25 avec AcONH₄ 0,1 M, pH 9, comme éluant. L'éluat fut dialysé dans de l'eau. La concentration de la solution finale, déterminée à l'aide du réactif de Bio-Rad pour dosage des protéines (mesure de l'absorbance à 595 nm) était de 72 µM. Lors de l'électrophorèse, une nouvelle tache bleue a été détectée à l'oeil nu.

2.5.2. Préparation de PlgG-polylysine-ZnPc: une solution de ZnPc-(COOH)₄-polylysine (72 nmoles/1 ml), d'EDAC (100 µg/100 µl, 0,52 µmole), et de NHSS (100 µg dans 100 µl, 0,52 µmole), à pH 5 dans de l'eau, a reposé 1 heure à 25°C. Furent ajoutés des PlgG (1 mg/100 µl, 6,6 nmoles), et le pH fut ajusté à 9. Après 16 heures à température ambiante, le mélange fut passé sur une colonne de Sephadex G-100, élué avec AcONH₄, pH 9, centrifugé, et concentré.

Tableau 1. Nombre de ZnPc liés à l'albumine (BSA) et aux PlgG.

	Conjugué			
	BSA-ZnPc	PlgG-ZnPc	PlgG-d-ZnPc	PlgG-pl-ZnPc
ZnPc/protéine	9,5	11	12,5	10

Les Pc ont été détectées à 670 nm; les protéines ont été détectées à 595 nm avec le réactif de Bio-Rad pour dosage des protéines.

3. Obtention des tumeurs chez les animaux:

3.1. Tumeurs EMT-6: 2×10^5 cellules tumorales EMT-6 (provenant d'un adénocarcinome mammaire de souris) furent inoculées de façon intradermique, au niveau de la cuisse, chez des souris BALB/c mâles de 20-25 g. Au moment de l'injection des produits marqués, environ 1 semaine après inoculation des cellules, les tumeurs avaient entre 3 et 10 mm de diamètre.

3.2 Tumeurs MAC: $2,5 \times 10^7$ cellules MAC (provenant d'un adénocarcinome murin du colon) ont été injectées de façon intra-péritonéale dans la cavité abdominale d'un rat Fischer femelle. Quand le ventre de l'animal a commencé à montrer des signes évidents de gonflement, les fluides d'ascites ont été retirés à l'aide d'une seringue de 10 cc après perforation de la paroi abdominale, puis centrifugés (environ 1 minute à 2500 tpm). Le surnageant, contenant beaucoup de globules rouges hémolysés, a été enlevé, et le culot été plusieurs fois resuspendu et recentrifugé dans PBS. Les cellules MAC du culot ont ensuite été resuspendues dans un volume final de 10 ml de PBS, puis leur concentration a été évaluée à l'aide d'une chambre cytométrique et d'un microscope. Elles ont alors été diluées à 9×10^6 /ml de PBS. 100 μ l de cette solution cellulaire ont été injectés de façon intradermique, au niveau de la cuisse, à des rats Fischer femelles de 200-250 g. Au moment de l'injection des produits marqués, environ une semaine après inoculation des cellules MAC, les tumeurs avaient un diamètre d'à peu près 10 mm.

4. Marquage des protéines et des conjugués protéine-ZnPc:

4.1. Marquage à l'iode: Dans un tube conique de 0,5 ml, dont la paroi interne était recouverte d'une pellicule d'Iodogen, fut introduit une solution de la protéine à

marquer en plus d'une solution d'iode radioactif (Na^{125}I ou Na^{131}I). Le mélange a été laissé 20 minutes à température ambiante, avec rotation constante du tube, et a ensuite été transféré dans un tube conique de 1,5 ml, avant d'être passé sur une colonne de Bio-Gel P-30 ou de Sephadex G-10, équilibrée avec du PBS. Le produit fut élué avec le même tampon et 20 fractions d'environ 0,5 ml furent recueillies. La radioactivité des fractions fut évaluée avec un calibrateur clinique (Radionuclide calibrator model 4050, Radcal Corporation) et les fractions correspondant au sommet du premier pic d'élution furent rassemblées. Les tableaux 2 et 3 précisent les conditions de marquage de chaque produit dans le cadre des différentes expériences.

TABEAU 2. Conditions de marquage à l' ^{125}I des protéines et des conjugués protéine-ZnPc utilisés pour les blodistributions dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Paramètre	Conditions de marquage						
	Produit						
	A	B	C	D	E	F	G
Iodogen (μg)	200	200	300	500	100	500	10
Produit (mg)	7,2	8	4,8	1,3	0,3	0,5	0,15
^{125}I (mCi)	1	1	1	0,6	2,7	0,5	0,5
Filtration	P-30	P-30	P-30	P-30	P-30	P-30	P-30

A : PlgG; B: BSA; C: LDL; D: BSA-ZnPc; E: PlgG-ZnPc; F: PlgG-dextran-ZnPc; G: PlgG-polylysine-ZnPc.

TABEAU 3. Conditions de marquage à l' ^{131}I des protéines utilisées pour l'imagerie gamma de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6 et de rats Fischer portant des tumeurs MAC.

Paramètre	Conditions de marquage		
	Protéine		
	BSA	PlgG	BSA
Iodogen (μg)	300	500	300
Protéine (mg)	1	2	15
^{131}I (mCi)	0,98	1,63	5
Filtration	G-10	G-10	G-10
Animal	Souris	Souris	Rat

4.2. Marquage au technetium: 60 mCi de pertechnetate de ^{99m}Tc (dans 2,2 ml de NaCl 0,9 %) ont été ajoutés à 2 mg de PlgG pré-réduits, lyophilisés et sous atmosphère d'azote dans une fiole scellée, provenant d'un kit de marquage d'immunoglobulines G (Rho-Med Inc.). Le pourcentage de marquage des protéines a été évalué par chromatographie sur papier (Whatman #1) avec méthanol 80 % comme éluant. Le ^{99m}Tc non lié migre avec le front de solvant, tandis que le ^{99m}Tc incorporé aux PlgG reste au bas du papier. La bande de papier a donc été coupée en deux, au centre, et la radioactivité des deux morceaux a été déterminée par comptage dans un compteur gamma. En calculant le rapport $\text{activité}_{\text{bas}}/\text{activité}_{\text{bas} + \text{haut}}$, on peut évaluer le pourcentage d'incorporation du radioisotope aux PlgG, qui dans notre cas est supérieur à 95 %.

5. Injection des produits marqués:

TABLEAU 4. Paramètres d'injection des produits marqués à l' ^{125}I , pour biodistribution dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Paramètre	Produit						
	A	B	C	D	E	F	G
Volume (μl)	100	100	100	100	100	100	100
Produit (μg)	4,6	9,2	3	4,5	2,9	3,4	0,7
Activité (μCi)	5,4	3	3,1	2	1,2	0,9	1

A: BSA; B: PlgG; C: LDL; D: BSA-ZnPc; E: PlgG-ZnPc; F: PlgG-dextran-ZnPc; G: PlgG-polylysine-ZnPc

Les différents produits marqués ont été injectés avec des seringues de 1 cc dans la veine caudale des animaux, dilatée par immersion dans l'eau chaude. Les quantités injectées de protéines ont été déterminées par mesure colorimétrique à 595 nm en employant le réactif de Bio-Rad pour dosage des protéines. La radioactivité

injectée a été déterminée par comptage des solutions avec un compteur gamma.
Les tableaux 4 et 5 résument l'étape d'injection des produits marqués.

TABLEAU 5. Paramètres d'injection des produits marqués à l' ^{131}I , au ^{67}Ga , et au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, pour l'imagerie gamma de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6 et de rats Fischer portant des tumeurs MAC.

Paramètre	Produit			
	BSA	PigG	BSA/PigG	Citrate/PigG
Volume (μl)	200	200	300	300
Produit (μg)	133	200	1,17/0,16	1,0/0,2
Isotope	^{131}I	^{131}I	$^{131}\text{I}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	$^{67}\text{Ga}/^{99\text{m}}\text{Tc}$
Activité (μCi)	91	92	0,8/4,7	1,0/6,0
Animal	Souris	Souris	Rat	Rat

6. Dissection des souris BALB/c:

Après différents temps (entre 1 h et 50 h post-injection), pendant que les souris étaient anesthésiées à l'éther, les veines axillaires ont été sectionnées, et le sang recueilli à l'aide d'une seringue de 5 cc munie d'une aiguille de grosseur 18 de 3,75 cm de long. Les animaux ont ensuite été sacrifiés en leur ouvrant la cage thoracique et en leur enlevant le coeur. Les tissus d'intérêt ont été prélevés, rincés avec de la solution saline (0,15 M NaCl), égouttés sur du tissu absorbant, et mis dans des tubes pré-pesés. Ces tubes ont alors été repesés pour évaluer le poids des différents tissus, et ont été comptés dans un compteur gamma, en même temps que des tubes contenant des dilutions des doses injectées.

7. Scintigraphies gamma:

7.1. Souris BALB/c: à différents temps post-injection (de 3 h à 168 h), les animaux entiers vivants ont été immobilisés sur des plaques de verre, et des images gamma des souris ont été prises par une caméra gamma dotée d'un collimateur "pinhole", qui offre une résolution optimale pour les petits sujets se trouvant près de l'extrémité du collimateur (Early *et al.*, 1979), et reliée à un système informatique (Cromenco System Three) qui recueillait les images sur disquette magnétique pour visionnement et traitement ultérieur sur un système Cybernex. Le détecteur était réglé sur le pic de 364 keV de l' ^{131}I . L'exposition des animaux était contrôlée par le nombre de comptes détectés par la caméra (fixé à 120 000 pour l'animal en entier).

7.2. Rats Fischer: 24 h post-injection, après que les animaux ont été anesthésiés avec 100 μl d'un mélange rompun (xylazine) + kétamine, des photographies gamma des rats ont été prises avec le même système d'imagerie que celui utilisé pour les souris BALB/c (7.1.). Le détecteur était réglé soit sur le pic de radioactivité de 300 keV du ^{67}Ga , soit sur le pic de 364 keV de l' ^{131}I , soit sur celui de 140 keV du $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

8. Traitement statistique des résultats:

Les expériences de biodistribution animale ont pratiquement toutes été effectuées avec 5 animaux. De manière à corriger pour le faible échantillonnage statistique, l'écart associé à la moyenne arithmétique des résultats est l'écart-type de la moyenne (ÉTM), pour lequel l'écart-type est divisé par la racine du nombre d'animaux utilisés pour les expériences.

Résultats

1. Biodistribution des protéines natives marquées à l'iode-125:

Les résultats des biodistributions dans les souris BALB/c des trois protéines marquées ($[^{125}\text{I}]$ -BSA, $[^{125}\text{I}]$ -PIgG, $[^{125}\text{I}]$ -LDL) sont regroupés dans les tableaux 6 à 11. Le tableau 6 montre l'activité de $[^{125}\text{I}]$ -BSA dans différents tissus, en fonction du temps post-injection. Après 1 heure, la radioactivité est surtout concentrée dans le sang, les

TABLEAU 6. Biodistribution de $[^{125}\text{I}]$ -BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)				
	Temps post-injection: (heures)				
	1	3	6	24	50
Sang	36,76 \pm 1,54 (b)	24,96 \pm 0,81	17,79 \pm 0,15	5,77 \pm 0,13	1,58 \pm 0,19
Foie	4,11 \pm 0,41	3,22 \pm 0,17	2,15 \pm 0,15	0,77 \pm 0,06	0,32 \pm 0,03
Rate	2,94 \pm 0,19	2,80 \pm 0,10	2,14 \pm 0,08	0,84 \pm 0,06	0,23 \pm 0,03
Rein	6,52 \pm 0,34	5,28 \pm 0,27	4,66 \pm 0,16	1,49 \pm 0,08	0,69 \pm 0,06
Poumon	10,66 \pm 0,99	9,29 \pm 0,65	6,59 \pm 0,43	2,59 \pm 0,09	0,73 \pm 0,06
Peau	5,14 \pm 1,34	2,95 \pm 0,35	4,61 \pm 0,59	1,53 \pm 0,11	0,50 \pm 0,05
Muscle	0,95 \pm 0,04	1,19 \pm 0,14	0,91 \pm 0,12	0,39 \pm 0,06	0,10 \pm 0,01
Tumeur	7,59 \pm 1,15	5,13 \pm 0,45	9,12 \pm 0,21	3,74 \pm 0,83	1,41 \pm 0,20
Colon	1,56 \pm 0,09	2,45 \pm 0,36	1,63 \pm 0,35	0,50 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 4,6 μg (5,4 μCi) de $[^{125}\text{I}]$ -BSA.

poumons, et la tumeur, et elle est plus faible dans le colon et le muscle. Exception faite du muscle, de la tumeur, et du colon, la radioactivité est maximale dans tous les tissus à 1 heure post-injection. La captation maximale dans le muscle se situe à 3 heures post-injection, celle de la tumeur à 6 heures, et celle du colon également

à 3 heures. A partir de 6 heures après injection, l'activité est plus concentrée dans la tumeur que dans tous les autres tissus, sauf le sang, qui restera le tissu le plus radioactif jusqu'à 50 heures post-injection, mais dont la différence d'activité avec la tumeur aura tendance à diminuer. L'activité reste plus faible dans le muscle et le colon pour toute la durée de l'expérience. La moyenne des rapports tumeur/tnt de l'activité de [¹²⁵I]-BSA est toujours supérieure à 1, entre 1 heure et 50 heures (Tableau 7), et atteint environ 5 après 50 heures, où le rapport act_{tumeur}/act_{rate} est de 6,13,

TABLEAU 7. Activité de [¹²⁵I]-BSA dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur} /Activité _{tnt}) (a)				
	Temps post-injection (heures)				
	1	3	6	24	50
Sang	0,21 ± 0,04 (b)	0,21 ± 0,03	0,52 ± 0,01	0,65 ± 0,16	0,89 ± 0,23
Foie	1,85 ± 0,46	1,59 ± 0,23	4,24 ± 0,38	4,86 ± 1,45	4,41 ± 1,03
Rate	2,58 ± 0,55	1,83 ± 0,23	4,26 ± 0,24	4,45 ± 1,30	6,13 ± 1,66
Rein	1,16 ± 0,23	0,97 ± 0,14	1,96 ± 0,11	2,51 ± 0,69	2,04 ± 0,46
Poumon	0,71 ± 0,17	0,55 ± 0,09	1,38 ± 0,12	1,44 ± 0,37	1,93 ± 0,43
Peau	1,48 ± 0,61	1,74 ± 0,36	1,98 ± 0,29	2,44 ± 0,71	2,82 ± 0,68
Muscle	7,99 ± 1,53	4,31 ± 0,89	10,02 ± 1,52	9,59 ± 3,59	14,10 ± 3,38
Colon	4,87 ± 1,01	2,09 ± 0,49	5,59 ± 1,31	7,48 ± 1,94	7,83 ± 2,40
Moyenne	2,61 ± 0,57 (c)	1,66 ± 0,31	3,74 ± 0,50	4,18 ± 1,28	5,02 ± 1,28

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) (% DI/g_{tumeur})/(% DI/g_{tnt}) ± 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (activité_{tumeur})/(activité_{tnt}) ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 4,6 µg (5,4 µCi) de [¹²⁵I]-BSA.

celui de l' act_{tumeur}/act_{colon} est de 7,83, et celui de l' $act_{tumeur}/act_{muscle}$ est de 14,10. Il est à noter que la captation de [¹²⁵I]-BSA par le foie est toujours assez faible par rapport à la captation par d'autres tissus, la peau par exemple.

Le tableau 8 contient les résultats de la biodistribution des [¹²⁵I]-PIgG. 1 heure après injection, les sites de concentration élevée de l'activité sont surtout le sang,

les poumons, et les reins. Le muscle et le colon, comme dans le cas de [¹²⁵I]-BSA, sont les tissus où se concentre moins la radioactivité, et l'activité dans la tumeur

TABLEAU 8. Biodistribution de [¹²⁵I]-PIgG dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)				
	Temps post-injection (heures)				
	1	3	6	24	50
Sang	32,41 ± 0,83(b)	32,26 ± 1,23	25,14 ± 1,94	18,97 ± 0,71	16,89 ± 0,93
Foie	5,56 ± 0,33	4,16 ± 0,21	3,61 ± 0,17	2,52 ± 0,22	2,68 ± 0,32
Rate	5,72 ± 0,11	4,80 ± 0,19	4,42 ± 0,14	3,52 ± 0,19	2,74 ± 0,31
Rein	8,05 ± 0,46	7,83 ± 0,32	6,13 ± 0,46	4,63 ± 0,18	4,21 ± 0,30
Poumon	14,05 ± 1,14	13,78 ± 0,66	9,39 ± 0,55	7,67 ± 0,60	5,51 ± 0,39
Peau	1,58 ± 0,13	1,64 ± 0,09	2,33 ± 0,23	6,77 ± 0,49	4,94 ± 0,41
Muscle	0,80 ± 0,02	0,82 ± 0,04	0,64 ± 0,04	1,22 ± 0,03	1,21 ± 0,17
Tumeur	4,21 ± 0,37	7,95 ± 0,41	9,11 ± 0,86	15,54 ± 0,57	23,46 ± 4,15
Colon	1,28 ± 0,12	1,62 ± 0,08	1,23 ± 0,10	0,90 ± 0,04	0,84 ± 0,09

(a)Activité moyenne pour 5 souris. (b)%DI/g ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 9,2 µg (3 µCi) de [¹²⁵I]-PIgG.

est relativement faible. Par contre, à partir de 3 heures post-injection, la tumeur est, avec le sang et les poumons, dans le groupe des tissus qui montrent la plus grande concentration de la radioactivité. Et à partir de 24 heures, l'activité est, exception faite du sang, la plus élevée dans la tumeur, qui va même, à 50 heures, capter plus que le sang le produit marqué (23,46 %DI/g, pour la tumeur, contre 16,89 %DI/g pour le sang). Tout comme dans le cas de [¹²⁵I]-BSA, la moyenne des rapports act_{tumeur}/act_{tnt} est toujours supérieure à 1, et elle dépasse légèrement 10 au terme de l'expérience (Tableau 9). A ce moment, les rapports $act_{tumeur}/act_{muscle}$ et act_{tumeur}/act_{colon} atteignent respectivement 19,39 et 27,93. Mentionnons encore une fois que l'activité dans le foie est relativement faible, et celle dans les poumons, quant à elle, assez élevée.

TABEAU 9. Activité de [¹²⁵I]-PIgG dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{ref}) (a)				
	Temps post-injection (heures)				
	1	3	6	24	50
Sang	0,13 ± 0,01 (b)	0,25 ± 0,02	0,36 ± 0,06	0,82 ± 0,06	1,39 ± 0,33
Foie	0,76 ± 0,11	1,91 ± 0,19	2,52 ± 0,35	6,17 ± 0,79	8,75 ± 2,62
Rate	0,74 ± 0,08	1,66 ± 0,15	2,06 ± 0,25	4,41 ± 0,41	8,56 ± 2,51
Rein	0,52 ± 0,08	1,01 ± 0,09	1,49 ± 0,25	3,36 ± 0,27	5,57 ± 1,40
Poumon	0,30 ± 0,05	0,58 ± 0,06	0,97 ± 0,14	2,03 ± 0,24	4,26 ± 1,07
Peau	2,66 ± 0,46	4,85 ± 0,51	3,91 ± 0,74	2,29 ± 0,26	4,75 ± 1,25
Muscle	5,26 ± 0,60	9,69 ± 0,96	14,23 ± 2,17	12,74 ± 0,82	19,39 ± 6,21
Colon	3,29 ± 0,60	4,91 ± 0,49	7,41 ± 1,27	17,27 ± 1,46	27,93 ± 8,02
Moyenne	1,71 ± 0,25 (c)	3,11 ± 0,31	4,12 ± 0,65	6,14 ± 0,54	10,07 ± 2,93

(a) Activités moyennes pour 5 souris. (b) (%DI/g_{tumeur})/(%DI/g_{ref}) ± 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (Activité_{tumeur})/(Activité_{ref}) ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 9,2 µg (3 µCi) de [¹²⁵I]-PIgG.

La biodistribution des [¹²⁵I]-LDL (Tableau 10) est passablement différente de celle des deux autres protéines marquées. Tout d'abord, l'activité dans le sang, même après 1 heure, est assez faible, si on la compare à celles de [¹²⁵I]-BSA et des [¹²⁵I]-PIgG au même temps. C'est tout de même, après 1 heure, le sang qui montre l'activité la plus élevée, avec la rate et les poumons. A 3 heures post-injection, la radioactivité est maintenant surtout concentrée dans la rate, le sang, et le foie, la rate étant, à ce moment, l'organe qui capte le plus la protéine marquée. Après 13,5 heures, la radioactivité dans tous les tissus est inférieure à 1 %DI/g, sauf dans la rate, où l'activité est maximale (2,43 %DI/g). Les deux autres tissus les plus radioactifs sont le foie et la tumeur (0,95 % et 0,53 %DI/g, respectivement). 24 heures après injection, ce sont les mêmes tissus qu'à 13,5 heures qui montrent le plus d'activité, et après 50 heures, ce sont la rate, le foie, et les reins. Tout au long de l'expérience, c'est le muscle qui aura contenu le moins de radioactivité par gramme. Notons

TABEAU 10. Biodistribution de [¹²⁵I]-LDL dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)				
	Temps post-injection (heures)				
	1	3	13,5	24	50
Sang	9,14 ± 0,40 (b)	4,24 ± 0,26	0,27 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,10 ± 0,00
Foie	5,72 ± 0,31	3,00 ± 0,23	0,95 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,69 ± 0,03
Rate	8,65 ± 0,36	6,27 ± 0,57	2,43 ± 0,31	1,38 ± 0,10	1,05 ± 0,08
Rein	3,19 ± 0,19	1,72 ± 0,21	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,47 ± 0,04
Poumon	7,80 ± 0,30	2,71 ± 0,21	0,41 ± 0,08	0,23 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Peau	1,67 ± 0,09	0,89 ± 0,19	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,11 ± 0,02
Muscle	0,71 ± 0,06	0,45 ± 0,06	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Tumeur	4,88 ± 0,31	2,72 ± 0,52	0,53 ± 0,12	0,37 ± 0,07	0,34 ± 0,05
Colon	2,33 ± 0,47	1,71 ± 0,25	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,01

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 3 µg (3,1 µCi) de [¹²⁵I]-LDL.

que la tumeur atteint son maximum d'activité à t = 1 heure (4,88 %DI/g), et qu'elle capte, en moyenne, toujours plus que les autres tissus (Tableau 11),

TABEAU 11. Activité de [¹²⁵I]-LDL dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{int}) (a)				
	Temps post-injection (heures)				
	1	3	13,5	24	50
Sang	0,53 ± 0,05 (b)	0,64 ± 0,16	1,96 ± 0,52	1,95 ± 0,68	3,40 ± 0,51
Foie	0,85 ± 0,10	0,91 ± 0,24	0,56 ± 0,15	0,47 ± 0,11	0,49 ± 0,09
Rate	0,56 ± 0,06	0,43 ± 0,12	0,22 ± 0,08	0,27 ± 0,07	0,32 ± 0,07
Rein	1,53 ± 0,18	1,58 ± 0,49	2,79 ± 0,79	2,05 ± 0,62	0,72 ± 0,17
Poumon	0,63 ± 0,06	1,00 ± 0,27	1,29 ± 0,55	1,61 ± 0,45	3,40 ± 0,85
Peau	2,92 ± 0,33	3,06 ± 1,23	2,52 ± 0,94	1,48 ± 0,69	3,09 ± 1,03
Muscle	6,87 ± 0,99	6,04 ± 1,95	7,57 ± 1,74	4,63 ± 2,04	11,33 ± 1,70
Colon	2,09 ± 0,55	1,59 ± 0,53	2,79 ± 0,93	3,08 ± 1,10	1,89 ± 0,39
Moyenne	2,00 ± 0,29 (c)	1,91 ± 0,62	2,46 ± 0,71	1,94 ± 0,72	3,08 ± 0,60

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) (% DI/g_{tumeur})/(% DI/g_{int}) ± 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (activité_{tumeur})/(activité_{int}) ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 3 µg (3,1 µCi) de [¹²⁵I]-LDL.

atteignant un rapport act_{tumeur}/act_{tnt} de 3,08, après 50 heures. Des trois protéines marquées, les [125 I]-LDL sont donc celles qui se concentrent le moins au niveau de la tumeur et qui présentent le plus faible rapport maximal act_{tumeur}/act_{tnt} .

2. Biodistribution des conjugués protéine-ZnPc marqués à l'iode-125:

Les tableaux 12 à 19 présentent les résultats des biodistributions dans les souris BALB/c des quatre conjugués protéine-ZnPc marqués à l'iode-125 ([125 I]-BSA-ZnPc, [125 I]-IgG-ZnPc, [125 I]-IgG-dextran-ZnPc, et [125 I]-IgG-polylysine-ZnPc).

Le tableau 12 décrit l'accumulation de [125 I]-BSA-ZnPc dans différents tissus, en fonction du temps. 1 heure après injection du produit marqué, la concentration

TABLEAU 12. Biodistribution de [125 I]-BSA-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6,5	12	24	48
Sang	12,43 \pm 0,49 (b)	5,97 \pm 0,26	3,46 \pm 0,15	1,79 \pm 0,05	1,12 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01
Foie	9,60 \pm 0,48	3,33 \pm 0,15	2,08 \pm 0,06	1,67 \pm 0,05	1,26 \pm 0,04	1,13 \pm 0,05
Rate	7,27 \pm 0,19	1,91 \pm 0,13	1,36 \pm 0,13	0,84 \pm 0,06	0,55 \pm 0,03	0,32 \pm 0,02
Rein	7,21 \pm 0,11	2,90 \pm 0,17	1,37 \pm 0,06	0,79 \pm 0,04	0,48 \pm 0,02	0,49 \pm 0,07
Poumon	7,22 \pm 0,51	2,81 \pm 0,20	1,93 \pm 0,09	0,99 \pm 0,03	0,79 \pm 0,03	0,32 \pm 0,05
Peau	3,05 \pm 0,14	0,96 \pm 0,06	0,57 \pm 0,05	0,55 \pm 0,03	0,44 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03
Muscle	1,18 \pm 0,03	0,41 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,09 \pm 0,04
Tumeur	5,52 \pm 0,67	3,92 \pm 0,61	1,06 \pm 0,07	0,78 \pm 0,13	0,36 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02
Colon	1,81 \pm 0,08	1,56 \pm 0,08	0,82 \pm 0,09	0,72 \pm 0,09	0,10 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 4,5 μ g (2 μ Cl) de [125 I]-BSA-ZnPc.

de la radioactivité est plus élevée dans le sang, le foie, et la rate (avec respectivement 12,43 %, 9,60 %, et 7,27 %DI/g), tandis qu'elle est plus faible dans le colon et le muscle

(1,81 % et 1,18 %DI/g, respectivement). A 3 heures post-injection, la tumeur capte maintenant 3,92 %DI/g, plus que tous les autres tissus, mis à part le sang (5,97 %DI/g). Le foie capte un peu moins que la tumeur (3,33 %DI/g), et les tissus qui montrent le moins de radioactivité sont la peau et le muscle. Entre 6,5 heures et 24 heures après injection, ce sont le sang, le foie, et les poumons qui sont les tissus les plus radioactifs, tandis que la peau et le muscle (à 6,5 heures et 12 heures) ou le colon et le muscle (à 24 heures) captent moins le produit marqué. A $t = 48$ heures, le foie est le tissu le plus radioactif, suivi des reins et du sang. Et, comme à 24 heures post-injection, le muscle et le colon captent moins la protéine que tous les autres tissus. La radioactivité dans la tumeur atteint son maximum à 3 heures, et ne cesse dès lors de diminuer par rapport à celle dans la plupart des autres tissus, et le rapport $\text{act.}_{\text{tumeur}}/\text{act.}_{\text{tnt}}$ atteint lui-aussi son maximum 3 heures après injection, où il est de 2,85 (Tableau 13). Mentionnons tout de même que ce rapport

TABLEAU 13. Activité de $[^{125}\text{I}]\text{-BSA-ZnPc}$ dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{tnt}) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6,5	12	24	48
Sang	0,44 ± 0,07 (b)	0,66 ± 0,13	0,31 ± 0,03	0,43 ± 0,09	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,06
Foie	0,57 ± 0,10	1,18 ± 0,23	0,51 ± 0,05	0,47 ± 0,09	0,29 ± 0,02	0,12 ± 0,02
Rate	0,76 ± 0,11	2,05 ± 0,45	0,78 ± 0,13	0,93 ± 0,22	0,65 ± 0,07	0,44 ± 0,09
Rein	0,77 ± 0,10	1,35 ± 0,28	0,77 ± 0,09	0,99 ± 0,22	0,75 ± 0,07	0,29 ± 0,08
Poumon	0,76 ± 0,14	1,39 ± 0,31	0,55 ± 0,06	0,79 ± 0,16	0,45 ± 0,04	0,44 ± 0,13
Peau	1,81 ± 0,30	4,08 ± 0,87	1,86 ± 0,29	1,42 ± 0,32	0,82 ± 0,10	0,78 ± 0,24
Muscle	4,68 ± 0,68	9,56 ± 1,90	5,05 ± 0,59	4,87 ± 1,13	4,50 ± 0,23	1,55 ± 0,91
Colon	3,05 ± 0,50	2,51 ± 0,51	1,29 ± 0,23	1,08 ± 0,32	3,60 ± 0,54	2,33 ± 0,71
Moyenne	1,61 ± 0,25 (c)	2,85 ± 0,59	1,39 ± 0,18	1,37 ± 0,32	1,42 ± 0,14	0,79 ± 0,28

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g_{tumeur})/(% DI/g_{tnt}) ± 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (activité_{tumeur})/(activité_{tnt}) ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 4,5 µg (2 µCi) de $[^{125}\text{I}]\text{-BSA-ZnPc}$.

est toujours supérieur à 1, jusqu'à 24 heures post-injection, n'atteignant que 0,79 à $t = 48$ heures.

On peut voir dans le tableau 14 le schéma de distribution des $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG-ZnPc}$ après injection dans les souris. Peu de temps après le début de l'expérience (1 heure post-injection), la tumeur est parmi les tissus dans lesquels s'accumulent plus le produit marqué. On y retrouve alors 4,11 %DI/g. Le foie et les reins sont les deux autres

TABLEAU 14. Biodistribution de $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG-ZnPc}$ dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)					
	Temps en heures					
	1	3	6	13,5	24,5	48
Sang	2,78 \pm 0,20 (b)	1,57 \pm 0,21	1,25 \pm 0,17	1,23 \pm 0,06	1,01 \pm 0,03	0,32 \pm 0,01
Foie	6,98 \pm 0,32	3,89 \pm 0,21	3,73 \pm 0,22	4,94 \pm 0,24	4,78 \pm 0,19	2,57 \pm 0,12
Rate	3,66 \pm 0,21	2,27 \pm 0,07	2,35 \pm 0,21	1,79 \pm 0,09	1,51 \pm 0,07	0,89 \pm 0,06
Rein	7,19 \pm 0,17	4,63 \pm 0,18	4,35 \pm 0,24	3,23 \pm 0,18	2,57 \pm 0,13	1,13 \pm 0,08
Poumon	2,86 \pm 0,27	1,22 \pm 0,21	0,83 \pm 0,12	0,65 \pm 0,05	0,47 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01
Peau	1,70 \pm 0,22	1,21 \pm 0,17	0,95 \pm 0,18	0,31 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
Muscle	1,07 \pm 0,13	0,49 \pm 0,07	0,36 \pm 0,05	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
Tumeur	4,11 \pm 0,69	4,98 \pm 1,09	1,81 \pm 0,24	0,93 \pm 0,06	1,67 \pm 0,39	0,49 \pm 0,04
Colon	3,92 \pm 0,60	2,96 \pm 0,38	2,43 \pm 0,29	0,51 \pm 0,05	0,20 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 2,9 μg (1,2 μCi) de $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG-ZnPc}$.

organes les plus radioactifs, avec respectivement 6,98 % et 7,19 %DI/g. Ce sont la peau et le muscle qui, à ce moment, présentent les plus faibles concentrations de radioactivité. A 3 heures post-injection, la tumeur est le tissu où la protéine marquée s'accumule le plus (4,98 %DI/g), le foie et les reins étant les deux autres tissus de forte activité. A $t = 6$ heures, la tumeur est moins radioactive que plusieurs des autres tissus, et ce sont toujours les reins et le foie, en plus du colon, qui sont les plus

radioactifs, tandis que les poumons et le muscle contiennent très peu du produit marqué. Le foie est, à partir de 13,5 heures post-injection, l'organe où s'accumule le plus la protéine, suivi du rein et de la rate (à 13,5 heures et 48 heures post-injection) ou de la tumeur (à 24,5 heures post-injection). Le muscle continuera, comme à partir du début de l'expérience, d'être le tissu le moins radioactif, et ce jusqu'à 48 heures post-injection. Les autres sites de faible activité, à partir de 13,5 heures après injection, sont la peau (à 13,5 heures) et le colon (à partir de 24,5 heures). La concentration maximale de la radioactivité dans la tumeur (4,98 %DI/g) se situe à 3 heures post-injection, et le rapport act_{tumeur}/act_{int} est toujours supérieur

TABLEAU 15. Activité de [125 I]-PIgG-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{int}) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	13,5	24,5	48
Sang	1,48 ± 0,36 (b)	3,17 ± 1,12	1,45 ± 0,39	0,76 ± 0,08	1,65 ± 0,43	1,53 ± 0,17
Foie	0,59 ± 0,13	1,28 ± 0,35	0,49 ± 0,09	0,19 ± 0,02	0,35 ± 0,09	0,19 ± 0,02
Rate	1,12 ± 0,25	2,19 ± 0,55	0,77 ± 0,17	0,52 ± 0,06	1,11 ± 0,31	0,55 ± 0,08
Rein	0,57 ± 0,11	1,07 ± 0,28	0,42 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,65 ± 0,18	0,43 ± 0,06
Poumon	1,44 ± 0,38	4,08 ± 1,60	2,18 ± 0,60	1,43 ± 0,19	3,55 ± 0,97	2,58 ± 0,34
Peau	2,42 ± 0,72	4,11 ± 1,48	1,91 ± 0,61	3,00 ± 0,28	5,22 ± 1,36	2,88 ± 0,40
Muscle	3,84 ± 1,12	10,16 ± 3,69	5,03 ± 1,35	9,30 ± 0,56	18,55 ± 4,27	16,33 ± 1,31
Colon	1,05 ± 0,34	1,68 ± 0,59	0,74 ± 0,18	1,82 ± 0,29	8,35 ± 2,75	3,77 ± 0,88
Moyenne	1,56 ± 0,43 (c)	3,47 ± 1,21	1,62 ± 0,43	2,16 ± 0,19	4,93 ± 1,29	3,53 ± 0,41

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) (% DI/g_{tumeur})/(% DI/g_{int}) ± 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (activité_{tumeur})/(activité_{int}) ± 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 2,9 µg (1,2 µCi) de [125 I]-PIgG-ZnPc.

à 1 entre 1 heure et 48 heures après injection (tableau 15), atteignant 4,93 à 24,5 heures. Il est important de noter que le sang n'est jamais un des tissus où la radioactivité est élevée.

Le tableau 16 décrit la distribution des [125 I]-PIgG-dextran-ZnPc. Pour toute la durée de l'expérience (de 1 heure à 46 heures post-injection), la rate, les reins, et particulièrement le foie, sont les organes où s'accumule le plus la protéine marquée.

TABLEAU 16. Blodistribution de [125 I]-PIgG-d-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	12	24	46
Sang	2,64 \pm 0,09 (b)	1,59 \pm 0,08	1,22 \pm 0,06	1,00 \pm 0,02	0,76 \pm 0,03	0,42 \pm 0,03
Foie	4,70 \pm 0,15	4,32 \pm 0,07	3,85 \pm 0,29	4,00 \pm 0,05	4,30 \pm 0,15	2,99 \pm 0,16
Rate	4,52 \pm 0,38	3,01 \pm 0,16	2,44 \pm 0,17	3,07 \pm 0,18	2,30 \pm 0,09	1,75 \pm 0,07
Rein	4,69 \pm 0,53	2,49 \pm 0,07	1,66 \pm 0,12	1,17 \pm 0,07	1,05 \pm 0,06	1,40 \pm 0,06
Poumon	1,47 \pm 0,05	0,70 \pm 0,03	0,47 \pm 0,02	0,47 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
Peau	3,57 \pm 0,87	0,51 \pm 0,05	0,28 \pm 0,04	0,42 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	0,26 \pm 0,03
Muscle	2,93 \pm 0,71	0,41 \pm 0,07	0,17 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02
Tumeur	2,73 \pm 0,69	0,86 \pm 0,18	0,70 \pm 0,11	0,77 \pm 0,12	0,52 \pm 0,07	0,30 \pm 0,06
Colon	3,99 \pm 0,87	1,55 \pm 0,18	0,41 \pm 0,08	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,54 \pm 0,09

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 3,4 μ g (0,9 μ CI) de [125 I]-PIgG-d-ZnPc.

Ces trois organes montrent leur maximum de captation 1 heure après injection (4,70 %DI/g pour le foie, 4,52 %DI/g pour la rate, et 4,69 %DI/g pour les reins). Également à 1 heure post-injection, le sang et les poumons sont les tissus les moins radioactifs (avec 2,64 % et 1,47 %DI/g, respectivement), et la tumeur est elle-aussi parmi les sites de faible activité (avec 2,73 %DI/g), captant même moins que le muscle le (2,93 %DI/g) le produit marquée. Après 3 heures et 6 heures, la peau et le muscle sont les tissus où l'on retrouve le moins le produit marqué, et l'activité dans le sang est maintenant parmi les plus élevées, tandis que celle dans la tumeur est très faible par rapport à celle dans plusieurs des autres tissus, mais elle est deux fois (à 3 heures

post-injection) et quatre fois (à 6 heures post-injection) plus élevée que celle dans le muscle (Tableau 17). A 12 heures et à 24 heures après injection, ce sont maintenant le colon et le muscle qui sont les sites de moindre concentration de la radioactivité (avec respectivement 0,15 % et 0,12 %DI/g à 12 heures, et 0,15 % et 0,10 %DI/g à 24 heures), tandis que les rapports $act_{tumeur}/act_{muscle}$ sont de 6,42 à 12 heures, et 5,20 à 24 heures. Tout à la fin de l'expérience, à $t = 46$ h, les poumons et le muscle captent moins le produit marqué, tandis que le colon est maintenant parmi les organes qui sont les plus radioactifs. La tumeur montre une activité maximale 1 heure après injection du produit marquée (avec 2,73 %DI/g), et les rapports act_{tumeur}/act_{int} (Tableau 17) sont assez faibles, étant même inférieurs à 1 au début (1 heure et 3

TABLEAU 17. Activité de [125 I]-PIgG-d-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{int}) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	12	24	46
Sang	1,03 ± 0,29 (b)	0,54 ± 0,14	0,57 ± 0,12	0,77 ± 0,13	0,68 ± 0,11	0,71 ± 0,19
Foie	0,58 ± 0,16	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,03
Rate	0,60 ± 0,20	0,29 ± 0,08	0,29 ± 0,07	0,25 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,17 ± 0,04
Rein	0,58 ± 0,21	0,35 ± 0,08	0,42 ± 0,10	0,66 ± 0,14	0,49 ± 0,09	0,21 ± 0,05
Poumon	1,86 ± 0,53	1,23 ± 0,31	1,49 ± 0,30	1,64 ± 0,31	1,53 ± 0,24	1,25 ± 0,35
Peau	0,76 ± 0,37	1,69 ± 0,52	2,50 ± 0,76	1,83 ± 0,32	1,68 ± 0,43	1,15 ± 0,36
Muscle	0,93 ± 0,46	2,10 ± 0,80	4,12 ± 1,39	6,42 ± 1,50	5,20 ± 1,20	2,50 ± 0,92
Colon	0,68 ± 0,32	0,55 ± 0,18	1,71 ± 0,61	5,13 ± 1,11	3,47 ± 0,68	0,55 ± 0,20
Moyenne	0,88 ± 0,32 (c)	0,87 ± 0,27	1,41 ± 0,42	2,11 ± 0,45	1,67 ± 0,35	0,83 ± 0,27

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) $(\% DI/g_{tumeur})/(\% DI/g_{int}) \pm 1$ ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports $(activité_{tumeur})/(activité_{int}) \pm 1$ ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 3,4 µg (0,9 µCi) de [125 I]-PIgG-d-ZnPc.

heures post-injection) et à la fin (46 heures post-injection) de l'expérience. Ce rapport est maximal à 12 heures, où il est de 2,11.

Le tableau 18 montre les résultats de biodistribution obtenus pour les [125 I]-PIgG-polylysine-ZnPc. 1 heure après injection de la protéine marquée, ce sont les reins qui la captent le plus (avec 4,14 %DI/g), suivis de la rate (3,93 %DI/g) et du foie (3,23 %DI/g), tandis que les poumons et le muscle montrent les concentrations de radioactivité les plus basses (1,79 % et 1,42 %DI/g, respectivement). Ces deux tissus sont d'ailleurs, jusqu'à $t = 14$ heures, ceux où se concentre le moins le produit marqué. La tumeur est parmi les tissus qui sont plus radioactifs (avec 3,14 %DI/g, un peu moins

TABLEAU 18. Biodistribution de [125 I]-PIgG-pl-ZnPc dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Activité (% DI/g) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	14	23	47
Sang	2,85 \pm 0,18 (b)	0,71 \pm 0,05	0,22 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
Foie	3,23 \pm 0,19	0,92 \pm 0,15	0,36 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
Rate	3,93 \pm 0,44	1,15 \pm 0,17	0,50 \pm 0,09	0,08 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
Rein	4,14 \pm 0,41	1,49 \pm 0,17	0,73 \pm 0,06	0,21 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,22 \pm 0,03
Poumon	1,79 \pm 0,09	0,49 \pm 0,04	0,16 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
Peau	2,81 \pm 0,35	0,76 \pm 0,09	0,32 \pm 0,02	0,11 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,08 \pm 0,02
Muscle	1,42 \pm 0,05	0,41 \pm 0,06	0,12 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01
Tumeur	3,14 \pm 0,28	0,99 \pm 0,12	0,24 \pm 0,05	0,09 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,14 \pm 0,06
Colon	3,07 \pm 0,12	3,00 \pm 0,31	1,40 \pm 0,17	0,45 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI/g \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 0,7 μ g (1 μ CI) de [125 I]-PIgG-pl-ZnPc.

que pour le foie). 3 heures et 6 heures après injection, le colon est maintenant le tissu le plus radioactif (3,00 %DI/g à 3 heures et 1,40 %DI/g à 6 heures), dépassant largement la radioactivité dans les reins et dans la rate, qui sont eux-aussi des sites d'activité élevée. 14 heures après injection, le foie est, avec le colon et les reins, un des organes qui montrent une forte activité, tandis que la rate est maintenant

parmi les tissus moins radioactifs. Notons qu'à partir de ce moment toutes les concentrations de la radioactivité sont inférieures à 0,50 %DI/g. A $t = 23$ heures, les reins sont le site principal de la radioactivité (0,17 %DI/g), suivis du colon et du foie (avec respectivement 0,13 % et 0,09 %DI/g), tandis que la rate et le muscle sont les tissus où l'on retrouve le moins le produit marqué, et ce jusqu'à 47 heures post-injection, cependant qu'à ce même temps, la tumeur est, mis à part les reins, le tissu le plus radioactif. La tumeur montre son maximum de captation du produit marqué (3,14 %DI/g) à $t = 1$ heure, et, d'après le tableau 19, on peut voir que les rapports $\text{act.}_{\text{tumeur}}/\text{act.}_{\text{nt}}$ sont assez faibles, étant légèrement supérieurs où inférieurs à 1, sauf à 47 heures post-injection, où ce rapport est de 2,32.

TABEAU 19. Activité de [^{125}I]-PIgG-pl-ZnPc dans la tumeur par rapport à l'activité dans différents tissus, chez des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	(Activité _{tumeur})/(Activité _{nt}) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	14	23	47
Sang	1,10 \pm 0,17 (b)	1,39 \pm 0,26	1,09 \pm 0,23	1,00 \pm 0,22	0,71 \pm 0,28	2,00 \pm 0,86
Foie	0,97 \pm 0,14	1,08 \pm 0,31	0,67 \pm 0,20	0,75 \pm 0,15	0,55 \pm 0,28	1,17 \pm 0,60
Rate	0,80 \pm 0,16	0,86 \pm 0,23	0,48 \pm 0,19	1,13 \pm 0,27	1,25 \pm 0,50	3,50 \pm 1,51
Rein	0,76 \pm 0,14	0,66 \pm 0,15	0,33 \pm 0,10	0,43 \pm 0,09	0,29 \pm 0,13	0,64 \pm 0,36
Poumon	1,75 \pm 0,25	2,02 \pm 0,41	1,50 \pm 0,31	1,50 \pm 0,17	0,83 \pm 0,33	2,80 \pm 1,20
Peau	1,12 \pm 0,24	1,30 \pm 0,31	0,75 \pm 0,20	0,82 \pm 0,09	0,71 \pm 0,28	1,75 \pm 1,19
Muscle	2,21 \pm 0,28	2,41 \pm 0,64	2,00 \pm 0,42	3,00 \pm 0,33	2,50 \pm 1,00	4,67 \pm 3,56
Colon	1,02 \pm 0,13	0,33 \pm 0,07	0,17 \pm 0,06	0,20 \pm 0,03	0,38 \pm 0,21	2,00 \pm 1,15
Moyenne	1,22 \pm 0,19 (c)	1,26 \pm 0,30	0,87 \pm 0,21	1,10 \pm 0,17	0,90 \pm 0,38	2,32 \pm 1,30

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) (% DI/g_{tumeur})/(% DI/g_{nt}) \pm 1 ÉTM. (c) Moyenne de tous les rapports (activité_{tumeur})/(activité_{nt}) \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris, de façon intraveineuse caudale, 0,7 μg (1 μCi) de [^{125}I]-PIgG-pl-ZnPc.

La figure 3 montre l'activité des protéines natives et des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ^{125}I , dans le sang, la tumeur, les reins, le foie, et la thyroïde de souris

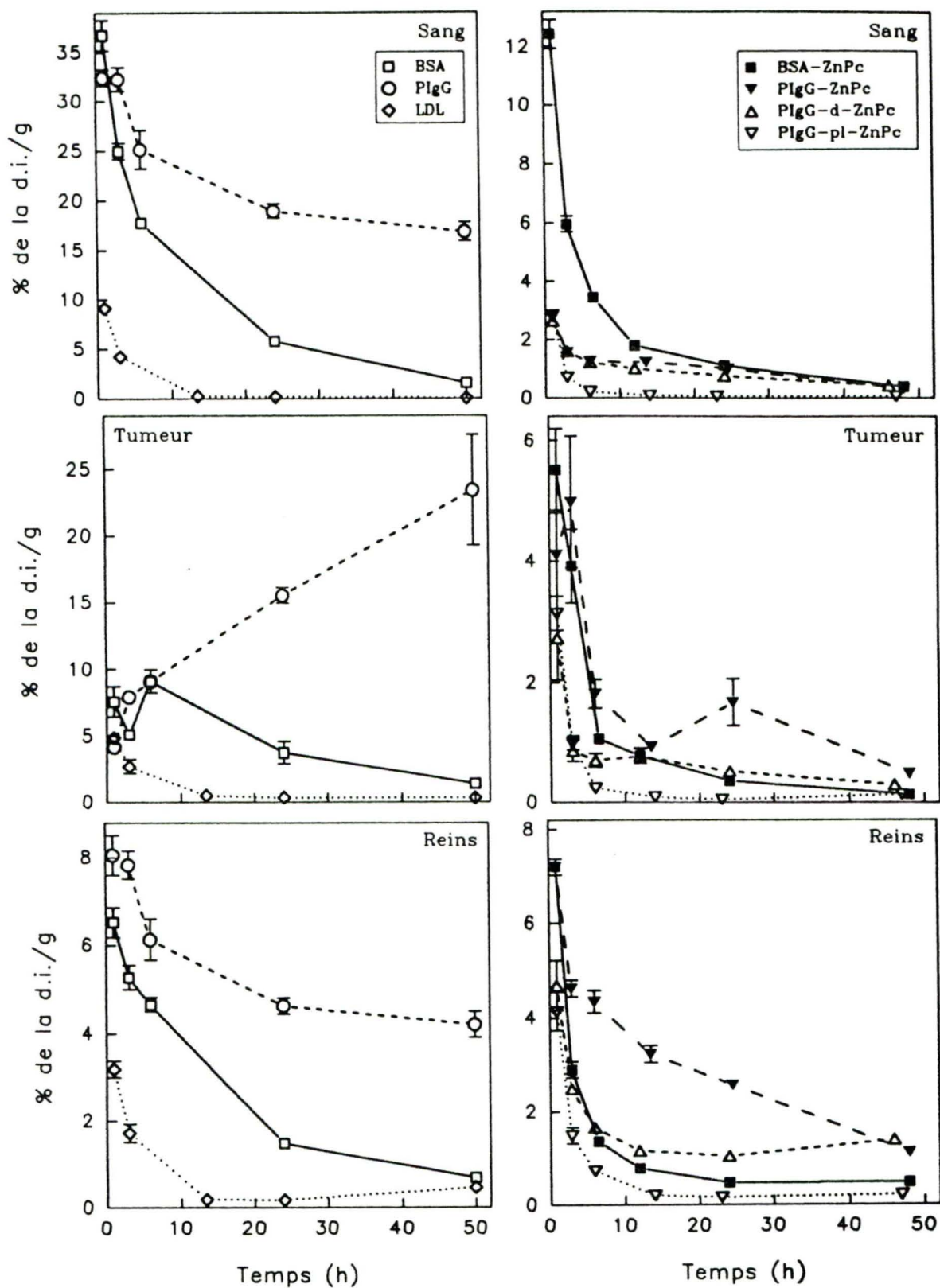


FIGURE 3. Activité des protéines et des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ^{125}I , dans le sang, la tumeur, les reins, le foie, et la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les points expérimentaux proviennent des tableaux 6,8,10,12,14,16, et 18 (suite p.36).

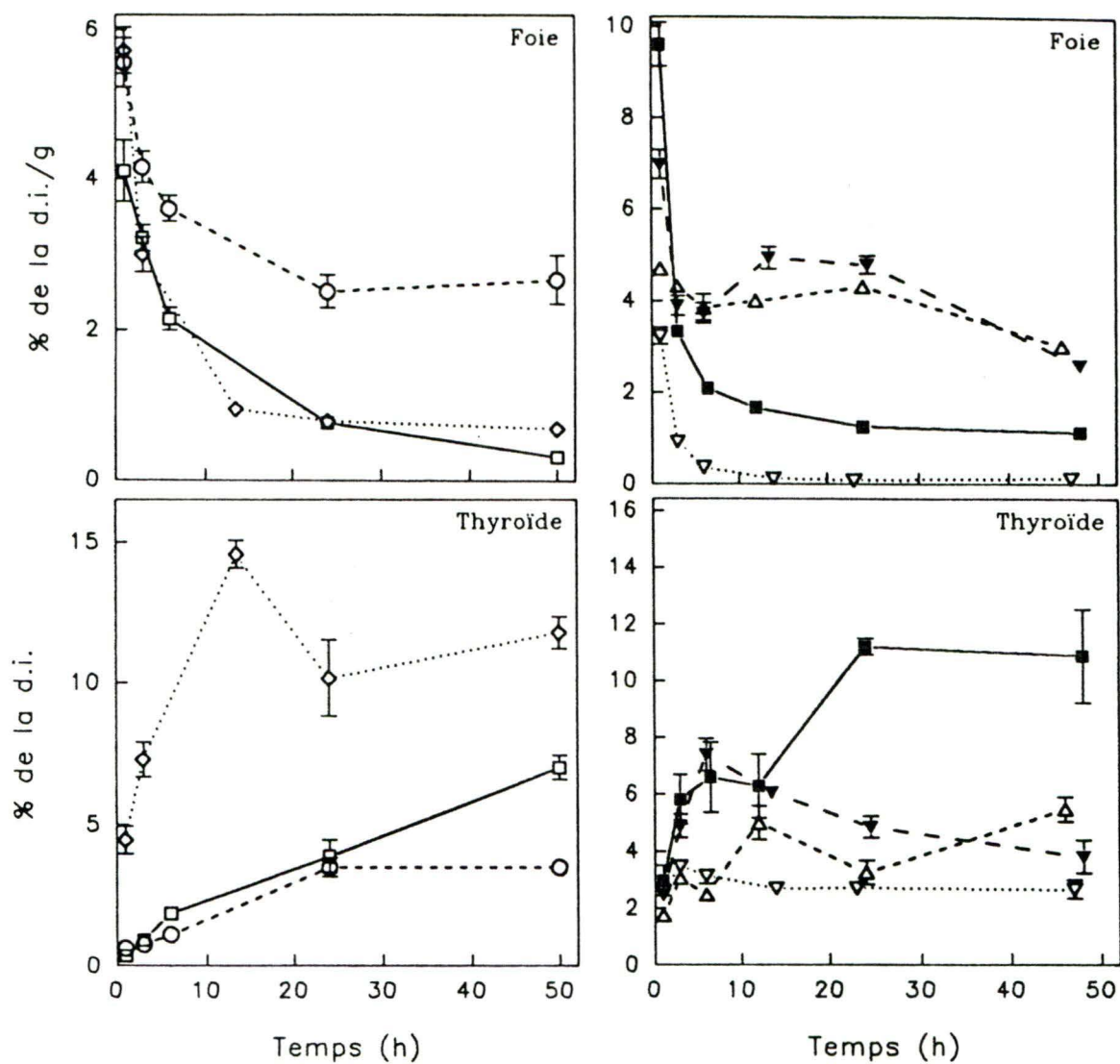


FIGURE 3. (Suite de la p.35).

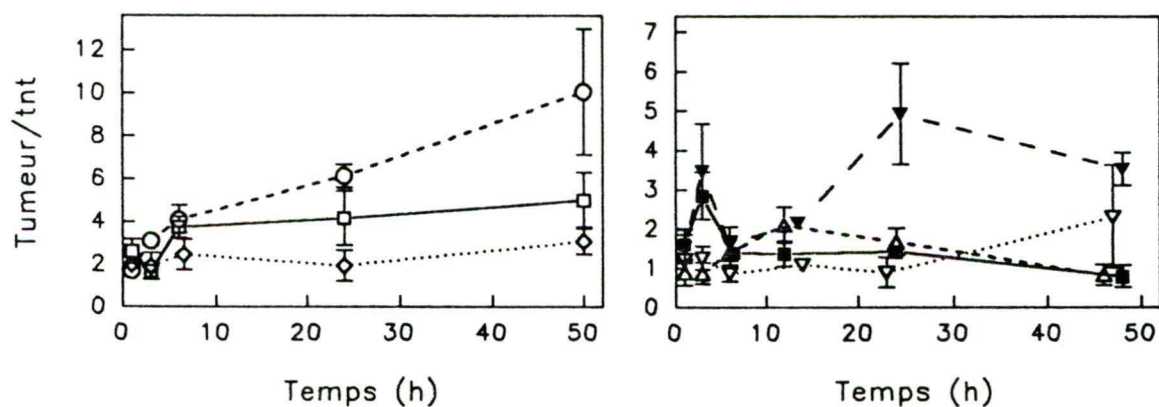


FIGURE 4. Activité des protéines et des conjugués protéine-ZnPc marqués à ^{125}I , dans la tumeur EMT-6 de souris BALB/c, par rapport à leur activité dans des tissus non-tumoraux. Les points expérimentaux sont les moyennes apparaissant dans les tableaux 7, 9, 11, 13, 15, 17, et 19.

BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les points expérimentaux ont été pris des tableaux 6, 8, 10, 12, 14, 16, et 18, et représentent la valeur moyenne pour 5 souris.

La figure 4 montre les rapports moyens $\text{activité}_{\text{tumeur}}/\text{activité}_{\text{int}}$ des protéines natives et des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ^{125}I , dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les points expérimentaux proviennent des tableaux 7, 9, 11, 13, 15, 17, et 19, et sont la moyenne pour 5 souris.

3. Cinétique d'élimination des produits marqués:

Les tableaux 20 et 21 rassemblent, sous forme de paramètres cinétiques, les résultats des biodistributions de tous les produits marqués. Ces résultats représentent des demi-vies ($t_{1/2}$) d'élimination ou des temps de doublement (t_2), entre 1 heure et 50 heures post-injection, des différentes protéines marquées, natives ou modifiées par le ZnPc, des (dans les) tissus comptés lors des dissections des animaux (voir en annexe pour la méthode de calcul des demi-vies).

3.1. Protéines natives marquées à l' ^{125}I :

Le [^{125}I]-BSA est éliminé plus rapidement du sang ($t_{1/2} = 11,27$ heures), et ensuite des poumons, de la rate, et du colon (avec respectivement des $t_{1/2}$ de 12,99 heures, 13,25 heures, et 13,70 heures), alors qu'il est expulsé plus lentement de la tumeur ($t_{1/2} = 20,63$ heures) et des reins ($t_{1/2} = 15,07$ heures). Le foie, la rate, et le colon montrent des temps similaires d'élimination de la protéine marquée.

TABEAU 20. Demi-vie des protéines marquées à l'¹²⁵I, dans des tissus de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Demi-vie de la protéine dans le tissu (heures) (a)		
	Protéine		
	[¹²⁵ I]-BSA	[¹²⁵ I]-PigG	[¹²⁵ I]-LDL
Sang	11,27 ± 0,38 (b)	52,12 ± 0,79	8,09 ± 0,06
Foie	13,76 ± 0,06	55,90 ± 6,55	18,49 ± 0,20
Rate	13,25 ± 0,42	52,11 ± 7,13	16,66 ± 0,04
Rein	15,07 ± 0,26	53,32 ± 0,83	20,45 ± 0,06
Poumon	12,99 ± 0,13	38,51 ± 0,43	8,64 ± 0,06
Peau	15,37 ± 0,56	27,18 ± 0,10 (c)	14,26 ± 0,43
Muscle	14,15 ± 0,11	63,01 ± 8,43 (c)	11,67 ± 0,25
Tumeur	20,63 ± 0,83	24,07 ± 1,27 (c)	13,89 ± 0,11
Colon	13,70 ± 0,08	62,34 ± 1,25	13,59 ± 0,51

(a) Demi-vie moyenne pour 5 souris. (b) Demi-vie ± 1 ÉTM. (c) Temps de doublement. La demi-vie est calculée entre 1 heure et 50 heures post-injection (voir en annexe pour la méthode de calcul des demi-vies).

TABEAU 21. Demi-vie des conjugués protéine-ZnPc marqués à l'¹²⁵I, dans des tissus de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Tissu	Demi-vie du conjugué dans le tissu (heures) (a)			
	Conjugué			
	[¹²⁵ I]-BSA-ZnPc	[¹²⁵ I]-PigG-ZnPc	[¹²⁵ I]-PigG-d-ZnPc	[¹²⁵ I]-PigG-pl-ZnPc
Sang	10,68 ± 0,07 (b)	18,34 ± 0,84	20,21 ± 0,36	10,99 ± 0,23
Foie	21,33 ± 0,00	54,15 ± 0,83	91,21 ± 3,74	12,03 ± 0,06
Rate	13,51 ± 0,03	27,39 ± 0,22	50,23 ± 7,71	7,72 ± 0,28
Rein	14,91 ± 0,67	20,03 ± 0,42	36,48 ± 1,11	12,96 ± 0,12
Poumon	12,65 ± 0,38	14,78 ± 0,58	22,80 ± 0,61	11,40 ± 0,20
Peau	15,61 ± 0,70	15,07 ± 0,63	21,87 ± 0,54	10,93 ± 0,38
Muscle	16,12 ± 2,87	10,21 ± 0,43	15,51 ± 0,31	9,85 ± 0,67
Tumeur	9,65 ± 0,00	16,70 ± 0,51	20,03 ± 0,28	12,67 ± 1,56
Colon	9,08 ± 0,29	9,17 ± 0,02	22,22 ± 0,35	8,00 ± 0,15

(a) Demi-vie moyenne pour 5 souris. (b) Demi-vie ± 1 ÉTM. La demi-vie est calculée entre 1 heure et 46-48 heures post-injection (voir en annexe pour la méthode de calcul des demi-vies).

Les [125 I]-PIgG montrent une cinétique très différente de celle de [125 I]-BSA. Tout d'abord, les temps d'élimination du produit sont beaucoup plus longs que dans le cas de [125 I]-BSA, et ce pour tous les tissus, les [125 I]-PIgG allant même jusqu'à s'accumuler dans certains tissus (la tumeur, la peau, et le muscle). Les poumons montrent le temps de séjour le plus court pour le produit marqué ($t_{1/2}$ = 38,51 heures), suivis de la rate (avec un $t_{1/2}$ de 52,11 heures), du sang ($t_{1/2}$ = 52,12 heures), et des reins ($t_{1/2}$ = 53,32 heures). Signalons que la demi-vie des [125 I]-PIgG dans le sang est presque cinq fois plus longue que celle de [125 I]-BSA. Les [125 I]-PIgG montrent, entre 1 heure et 50 heures après injection, une accumulation nette dans la tumeur (avec un temps de doublement (t_2) de 24,07 heures), la peau (t_2 = 27,18 heures), et dans le muscle, où la concentration du produit marqué augmente très lentement (t_2 de 63,01 heures). Dans le colon, le niveau de radioactivité diminue très lentement (avec un $t_{1/2}$ de 62,34 heures).

En ce qui concerne les [125 I]-LDL, elles sont éliminées du sang plus rapidement que de tous les autres tissus ($t_{1/2}$ = 8,09 heures). Les poumons et le muscle montrent également des vitesses d'élimination du produit marqué plus élevées que les autres tissus (avec des $t_{1/2}$ de 8,64 heures et 11,67 heures, respectivement), tandis qu'il persiste plus longtemps dans les reins ($t_{1/2}$ de 20,45 heures), le foie ($t_{1/2}$ de 18,49 heures), et la rate ($t_{1/2}$ de 16,66 heures). Il est à noter que les temps d'élimination des [125 I]-LDL sont plus courts que ceux de [125 I]-BSA et des [125 I]-PIgG, pour tous les tissus, sauf les reins, la rate, et le foie.

Le tableau 22 et la figure 3 montrent l'activité des protéines natives marquées à l' 125 I, dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les points expérimentaux de la figure 3 proviennent du tableau 22, et sont la moyenne pour

5 souris. La quantité de radioactivité dans la thyroïde est un signe du catabolisme des marquées ou de leur déhalogénéation (c'est à dire du détachement de l'iode radioactif des résidus tyrosine), puisque la thyroïde concentre spécifiquement l'iode et la tyrosine, précurseurs des hormones thyroïdiennes. Plus l'activité dans la thyroïde est élevée à un temps donné, plus la quantité de la protéine marquée qui a été dégradée est grande.

TABLEAU 22. Activité des protéines marquées à l' ^{125}I , dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Protéine	Activité (% DI) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	6	13,5	24	50
[^{125}I]-BSA	0,37 \pm 0,04 (b)	0,92 \pm 0,13	1,87 \pm 0,07	n.d.	3,89 \pm 0,57	7,02 \pm 0,43
[^{125}I]-PIgG	0,63 \pm 0,03	0,77 \pm 0,10	1,12 \pm 0,14	n.d.	3,50 \pm 0,34	3,50 \pm 0,21
[^{125}I]-LDL	4,46 \pm 0,48	7,30 \pm 0,62	n.d.	14,57 \pm 0,48	10,17 \pm 1,34	11,78 \pm 0,57

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris 4,6 μg (5,4 μCi) de [^{125}I]-BSA ou 9,2 μg (3 μCi) de [^{125}I]-PIgG ou 3 μg (3,1 μCi) de [^{125}I]-LDL.

3.2. Conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ^{125}I :

Dans le cas du conjugué [^{125}I]-BSA-ZnPc, c'est du colon qu'il est éliminé plus rapidement ($t_{1/2}$ = 9,08 heures). La tumeur ($t_{1/2}$ = 9,65 heures) et le sang ($t_{1/2}$ = 10,68 heures) sont les deux autres tissus dans lesquels le produit marqué persiste le moins longtemps, tandis qu'il séjourne pendant de plus longues périodes dans le foie, le muscle, et la peau (avec des $t_{1/2}$ respectifs de 21,33 heures, 16,12 heures, et 15,61 heures).

Pour ce qui est des [^{125}I]-PIgG-ZnPc et des [^{125}I]-PIgG-dextran-ZnPc, c'est du colon ou du muscle qu'ils sont éliminés plus promptement (avec des $t_{1/2}$ de 9,17 heures

pour les [^{125}I]-PlgG-ZnPc dans le colon, et 15,51 heures pour les [^{125}I]-PlgG-dextran-ZnPc dans le muscle). Les autres tissus dans lesquels la radioactivité baisse plus rapidement sont le muscle et les poumons ($t_{1/2}$ de 10,21 heures et 14,78 heures, respectivement) dans le cas des [^{125}I]-PlgG-ZnPc, et la tumeur et le sang ($t_{1/2}$ de 20,03 heures et 20,21 heures, respectivement) dans le cas des [^{125}I]-PlgG-dextran-ZnPc. Et pour les deux produits marqués, ce sont du foie, de la rate, et des reins, qu'ils sont éliminés plus lentement (avec respectivement des $t_{1/2}$ de 54,15 heures, 27,39 heures, et 20,03 heures pour les [^{125}I]-PlgG-ZnPc), et de 91,21 heures, 50,23 heures, et 36,48 heures pour les [^{125}I]-PlgG-dextran-ZnPc). Il est à remarquer que, de tous les produits marqués, les [^{125}I]-PlgG-dextran-ZnPc montrent le temps de demi-vie le plus long dans le foie (91,21 heures).

TABLEAU 23. Activité des conjugués protéine-ZnPc marqués à l' ^{125}I , dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

Conjugué	Activité (% DI) (a)					
	Temps post-injection (heures)					
	1	3	~ 6	~ 12	~ 24	~ 50
[^{125}I]-BSA-ZnPc	2,97 \pm 0,54 (b)	5,82 \pm 0,86	6,60 \pm 1,23	6,29 \pm 1,12	11,19 \pm 0,28	10,85 \pm 1,65
[^{125}I]-PlgG-ZnPc	2,48 \pm 0,11	4,89 \pm 0,41	7,39 \pm 0,57	6,06 \pm 0,22	4,85 \pm 0,38	3,82 \pm 0,57
[^{125}I]-PlgG-d-ZnPc	1,75 \pm 0,02	3,06 \pm 0,15	2,49 \pm 0,17	5,00 \pm 0,58	3,27 \pm 0,42	5,47 \pm 0,43
[^{125}I]-PlgG-pl-ZnPc	2,61 \pm 0,16	3,48 \pm 0,23	3,14 \pm 0,28	2,71 \pm 0,06	2,72 \pm 0,15	2,67 \pm 0,32

(a) Activité moyenne pour 5 souris. (b) % DI \pm 1 ÉTM. On a injecté à chaque souris 4,5 μg (2 μCi) de [^{125}I]-BSA-ZnPc ou 2,9 μg (1,2 μCi) de [^{125}I]-PlgG-ZnPc ou 3,4 μg (0,9 μCi) de [^{125}I]-PlgG-d-ZnPc ou 0,7 μg (1 μCi) de [^{125}I]-PlgG-pl-ZnPc.

Les [^{125}I]-PlgG-polylysine-ZnPc sont éliminés très rapidement de la rate ($t_{1/2}$ de 7,72 heures). Les tissus où la radioactivité persiste plus longtemps sont les reins ($t_{1/2}$ = 12,96 heures), la tumeur (avec un $t_{1/2}$ de 12,67 heures), et le foie ($t_{1/2}$ = 12,03 heures).

Le tableau 23 et la figure 3 montrent l'activité des conjugués protéine-ZnPc marqués

à I^{125} , dans la thyroïde de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les points expérimentaux de la figure 3 ont été pris du tableau 23, et représentent la valeur moyenne pour 5 souris.

4. Scintigraphies gamma:

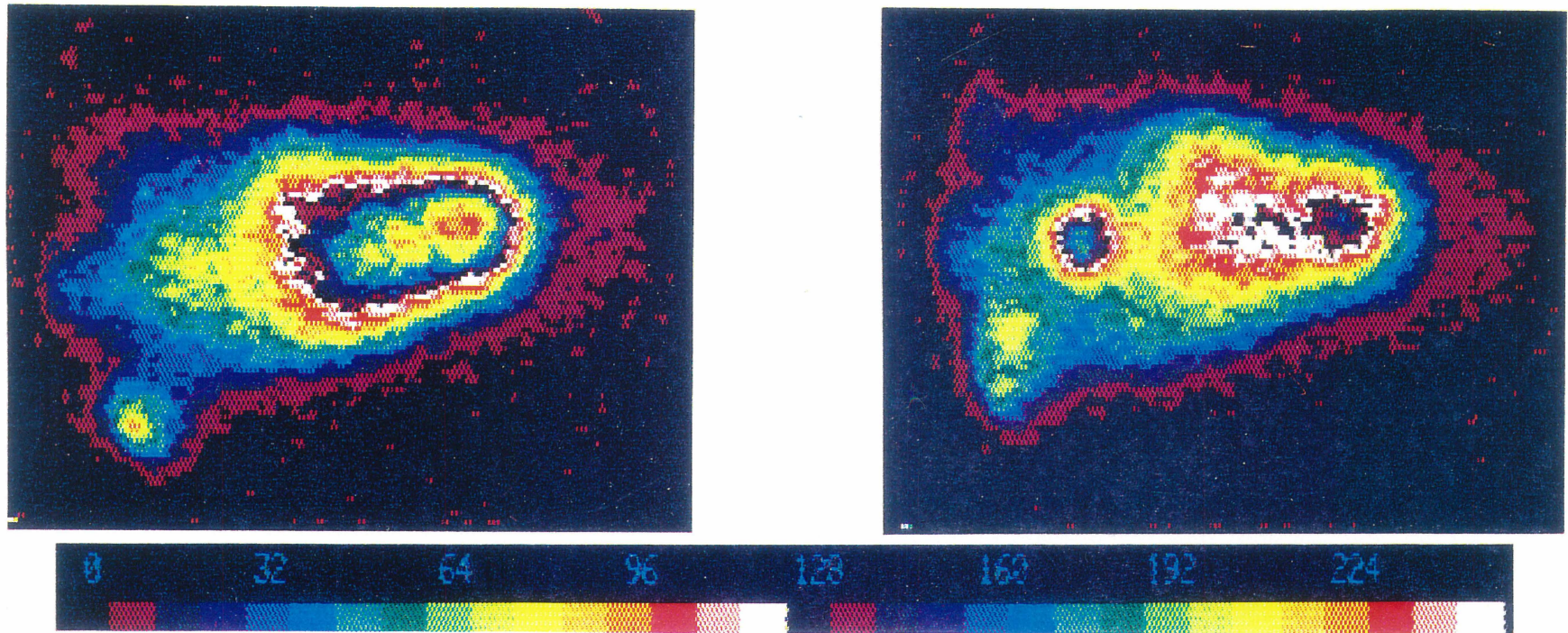
4.1. $[^{131}I]$ -PIgG et $[^{131}I]$ -BSA:

Les figures 5 à 7 montrent les images gamma obtenues 3 heures, 24 heures, et 168 heures après injection des $[^{131}I]$ -PIgG et de $[^{131}I]$ -BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

4.2. $[^{67}Ga]$ -citrate, $[^{99m}Tc]$ -PIgG, et $[^{131}I]$ -BSA:

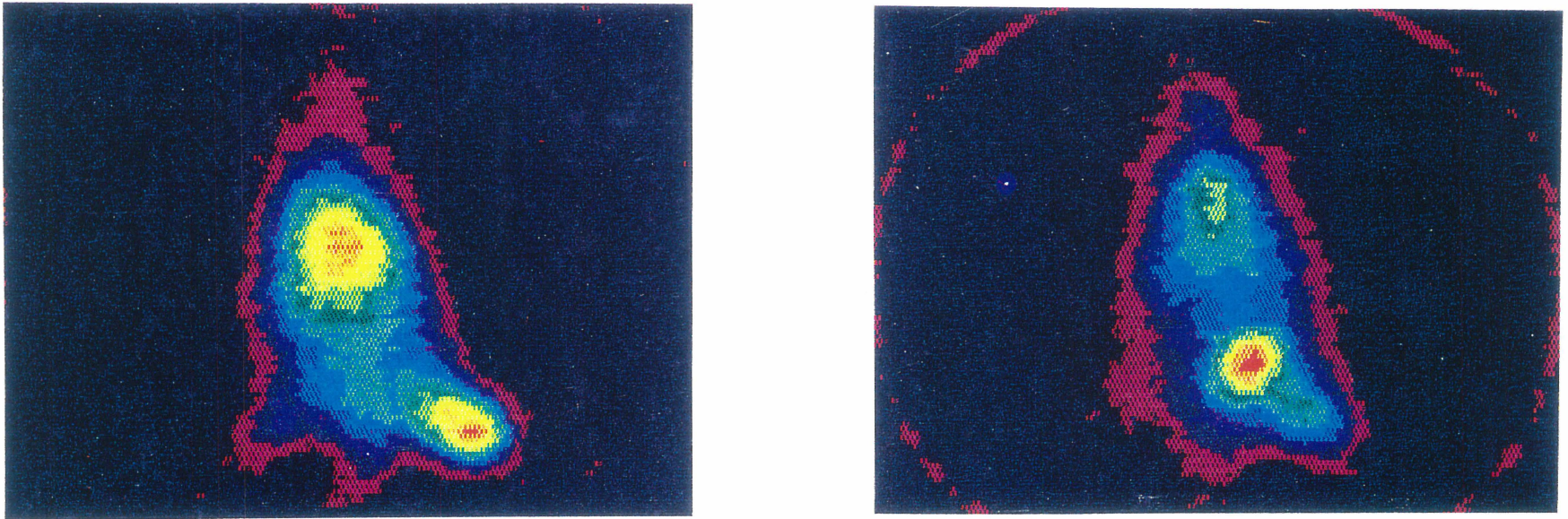
Les figures 8 et 9 montrent les images gamma obtenues 24 heures après injection du $[^{67}Ga]$ -citrate, des $[^{99m}Tc]$ -PIgG, et de $[^{131}I]$ -BSA dans des rats Fischer portant des tumeurs MAC.

FIGURE 5. Scintigraphies gamma des [^{131}I]-PlgG et de [^{131}I]-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 3 heures après injection des protéines marquées.



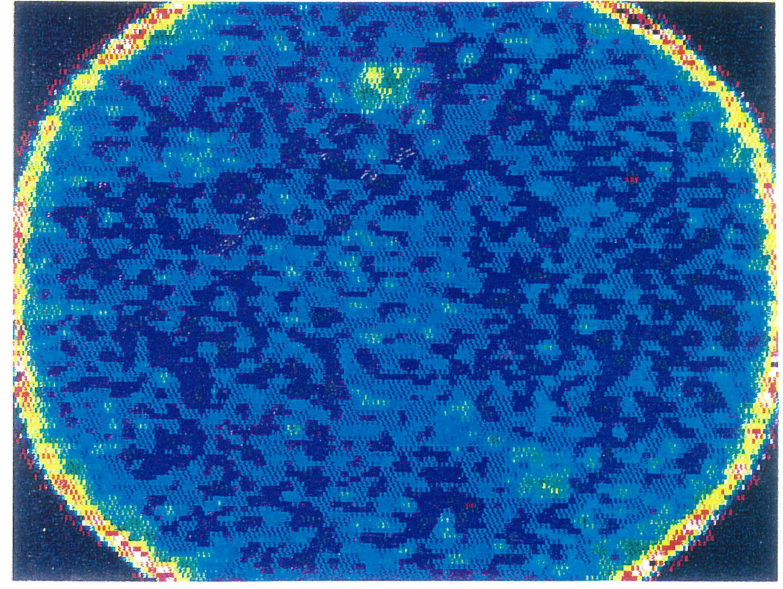
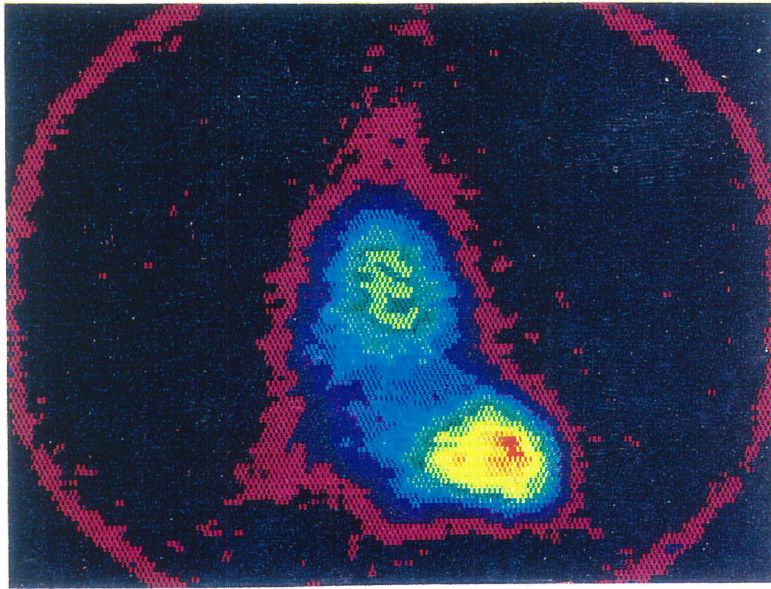
Les images montrent la distribution corporelle des [^{131}I]-PlgG (photo de gauche) et de [^{131}I]-BSA (photo de droite) 3 heures après leur injection dans les souris. On a injecté aux animaux, dans la veine caudale, 92 μCi (200 μg) de [^{131}I]-PlgG ou 91 μCi (133 μg) de [^{131}I]-BSA. Les couleurs correspondent à des densités de radioactivité (voir échelle au bas de l'image). Le violet et le bleu représentent de faibles niveaux d'activité, le vert et le jaune des niveaux intermédiaires, et le rouge, le blanc et le noir, des niveaux élevés d'activité. Les [^{131}I]-PlgG sont surtout concentrées dans la région thoracique (coeur et poumons, au milieu légèrement à droite) et dans le foie et les reins (en plein centre de la photo), avec des activités moins importantes dans la partie inférieure de l'abdomen et dans la vessie (au milieu à gauche). La captation par la tumeur (en bas à gauche) est hétérogène: elle est faible en périphérie, et d'intermédiaire à élevée au centre. La distribution de [^{131}I]-BSA est similaire à celle des [^{131}I]-PlgG. La captation par le foie est cependant moins importante, et la vessie est beaucoup plus radioactive, tandis que la tumeur montre une répartition un peu plus homogène de l'activité.

FIGURE 6. Scintigraphies gamma des [^{131}I]-PIgG et de [^{131}I]-BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 24 heures après injection des protéines marquées.



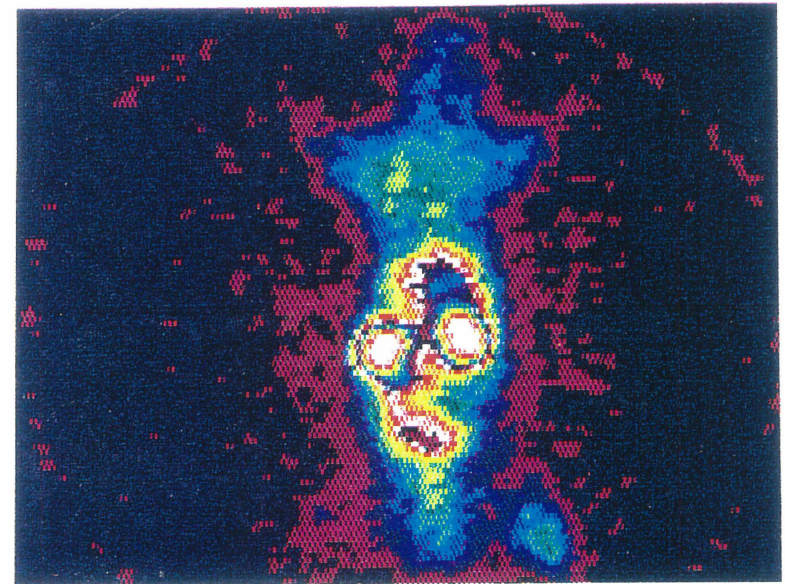
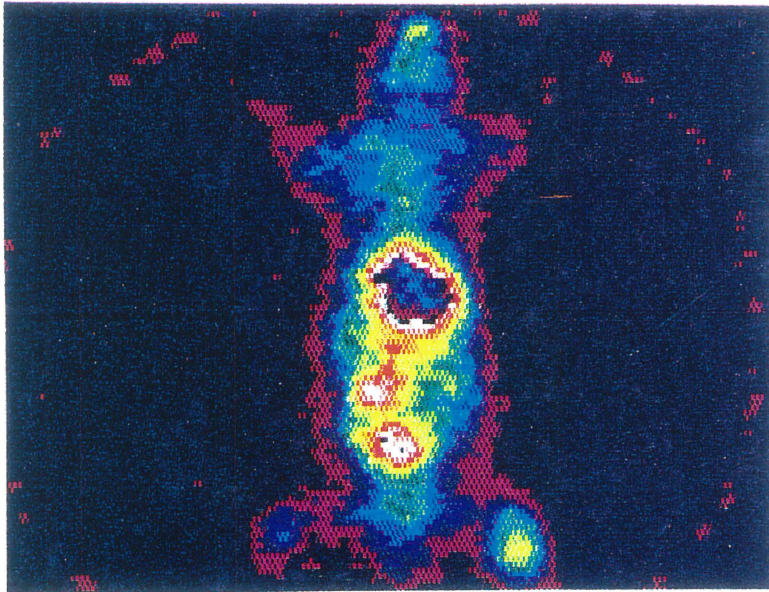
Les images montrent la distribution corporelle des [^{131}I]-PIgG (photo de gauche) et de [^{131}I]-BSA (photo de droite) 24 heures après leur injection dans les souris. On a injecté aux animaux, dans la veine caudale, 92 μCi (200 μg) de [^{131}I]-PIgG ou 91 μCi (133 μg) de [^{131}I]-BSA. Les [^{131}I]-PIgG sont surtout localisés dans le foie et la tumeur, avec des densités de radioactivité à peu près égales. L'activité dans les autres organes est faible. Le [^{131}I]-BSA se concentre principalement dans la vessie, qui montre une activité assez élevée. On remarque une région d'activité intermédiaire au niveau des poumons et du foie. La concentration de la protéine dans la tumeur n'est que légèrement plus élevée que celle que l'on retrouve dans le pool sanguin du reste de l'animal.

FIGURE 7. Scintigraphies gamma des ^{131}I -PIgG et de ^{131}I -BSA dans des souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6, 168 heures après injection des protéines marquées.



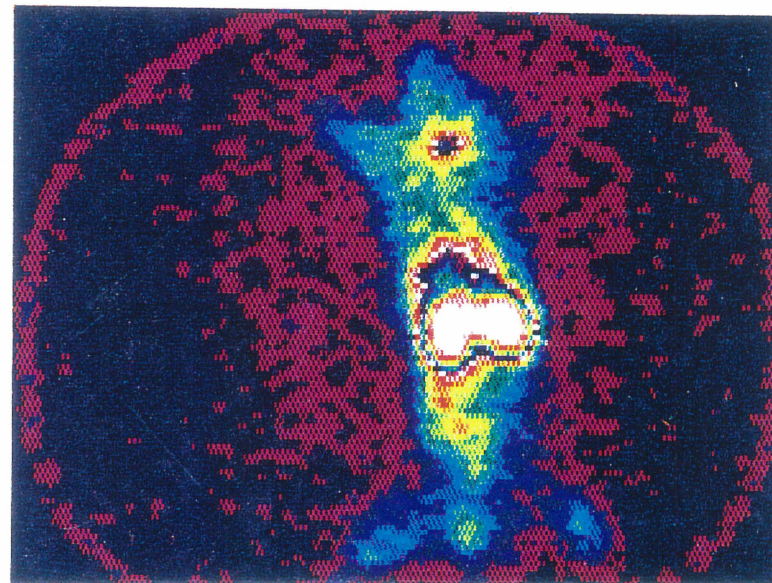
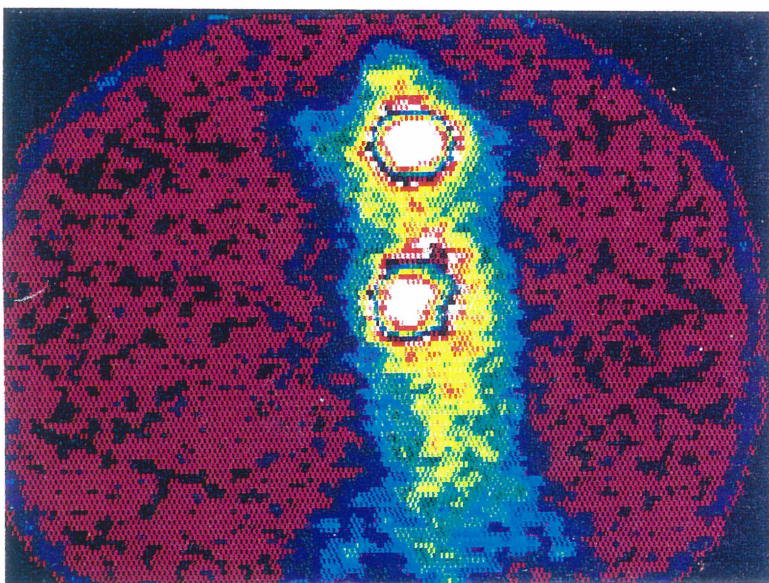
Les images montrent la distribution corporelle des ^{131}I -PIgG (photo de gauche) et de ^{131}I -BSA (photo de droite) 168 heures après leur injection dans les souris. On a injecté aux animaux, dans la veine caudale, 92 μCi (200 μg) de ^{131}I -PIgG ou 91 μCi (133 μg) de ^{131}I -BSA. Une semaine après leur injection dans la souris, les ^{131}I -PIgG se concentrent presque uniquement dans la tumeur, qui montre une densité de radioactivité. On peut également voir une zone d'activité intermédiaire dans la région du foie. Le ^{131}I -BSA a pratiquement été entièrement éliminé de l'animal. Tout ce qu'on voit, c'est le bruit de fond de la radioactivité. On peut quand même distinguer deux petites régions d'activité plus élevée: une (en haut au centre) correspond à la thyroïde, l'autre (en bas à droite) pourrait être la tumeur.

FIGURE 8. Scintigraphies gamma du [^{67}Ga]-citrate et des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG dans un rat Fischer portant une tumeur MAC, 24 heures après injection des produits marqués.



Les images montrent la distribution corporelle du [^{67}Ga]-citrate (photo de gauche) et des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG (photo de droite) 24 heures après leur injection dans le rat. On a injecté à l'animal, dans la veine caudale, 1 mCi (1 mg) de [^{67}Ga]-citrate et 6 mCi (0,2 mg) de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG. Le [^{67}Ga]-citrate se concentre surtout dans la région abdominale, particulièrement dans les organes du système réticuloendothélial (foie et rate) et dans la vessie. La tumeur sur la cuisse droite est bien visible, et on y retrouve une activité assez importante dans la zone centrale. La distribution des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG ressemble beaucoup à celle du [^{67}Ga]-citrate, mais on retrouve une activité plus élevée au niveau du thorax (cœur et poumons), des reins, et au site d'injection du mélange anesthésiant (épaule gauche). La tumeur capte un peu moins les [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG que le [^{67}Ga]-citrate.

FIGURE 9. Scintigraphies gamma de [^{131}I]-BSA et des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG dans un rat Fischer portant une tumeur MAC, 24 heures après injection des produits marqués.



Les images montrent la distribution corporelle de [^{131}I]-BSA (photo de gauche) et des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG (photo de droite), 24 heures après leur injection dans le rat. On a injecté à l'animal, dans la veine caudale, 0,8 mCi (1,17 mg) de [^{131}I]-BSA et 4,7 mCi (0,16 mg) de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG. Dans le cas de [^{131}I]-BSA, l'activité est faible dans la presque totalité de l'animal, sauf dans le foie et la thyroïde, où l'iode se concentre fortement. On ne distingue pas du tout la tumeur sur la cuisse droite. Les [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG se retrouvent principalement dans le foie et les reins, et également dans la thyroïde, quoique beaucoup moins que le [^{131}I]-BSA. La tumeur de ce rat capte plus faiblement les [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PlgG que la tumeur du rat précédent (Figure 16), mais tout de même plus que le [^{131}I]-BSA.

Discussion

1. Sélectivité tumorale:

Les trois protéines marquées montrent toutes un certain niveau de sélectivité tumorale dans le modèle que nous avons utilisé (souris BALB/c + tumeurs EMT-6). Le rapport moyen maximal de l'activité dans la tumeur vs l'activité dans les tissus non-tumoraux atteint $5,02 \pm 1,28$ pour [^{125}I]-BSA (Tableau 7 et figure 4), $10,07 \pm 2,93$ pour les [^{125}I]-PIgG (Tableau 9 et figure 4), et $3,08 \pm 0,60$ pour les [^{125}I]-LDL (Tableau 11 et figure 4), dans les trois cas à 50 heures après injection. Deux facteurs principaux peuvent expliquer la concentration préférentielle de ces protéines dans la région tumorale: 1) le métabolisme particulier des cellules tumorales, et 2) les caractéristiques physiologiques de l'environnement tumoral.

1.1. Métabolisme tumoral:

Comme les tumeurs sont des tissus qui prolifèrent à une vitesse élevée, elles ont besoin de quantités accrues de nutriments. On a montré, *In vitro* et *In vivo*, que les cellules tumorales peuvent accumuler des quantités importantes d'acides aminés (Christensen et Henderson, 1952; Christensen et Riggs, 1952; Wiseman et Ghadially, 1955). Les tumeurs peuvent être décrites comme des "pièges à azote", pour employer l'expression de Mider (1951). Les acides aminés y sont retenus pour être oxydés ou utilisés lors de la synthèse de protéines tumorales (Shapot, 1979). La sérine, par exemple, qui est impliquée dans la synthèse des protéines et de

certaines nucléotides, est captée en quantité élevée par certaines tumeurs (Sauer *et al.*, 1982). Cette augmentation de la captation des acides aminés par les tissus tumoraux provoque un déséquilibre du bilan de l'azote chez l'hôte, puisqu'il y a établissement d'un flux net de produits azotés des tissus normaux aux tissus néoplasiques (Kurzer et Meguid, 1986).

Si on a de bonnes raisons de croire que les protéines plasmatiques sont utilisées de façon accentuée par les tissus cancéreux comme source d'azote (Henderson et Lepage, 1959; Bush *et al.*, 1961), il n'est pas évident qu'elles sont internalisées par les tumeurs sous forme intacte. Cependant, des études par Cohen *et al.* (1961) ont montré, par des techniques d'immunohistochimie pour identifier les protéines dans les cellules, que les cellules d'hépatome de rat pouvaient internaliser l'albumine et les globulines entières, contrairement aux cellules du parenchyme hépatique de rat. Comme nous le verrons plus loin, les protéines peuvent également s'accumuler dans l'espace extracellulaire, sans pénétrer dans la cellule elle-même, leur accumulation étant facilitée par certaines caractéristiques particulières à la vascularisation tumorale. Ghose *et al.* (1962) ont démontré, à l'aide de méthodes de fluorescence directe et indirecte, que les hépatomes ne sont pas les seules cellules néoplasiques qui possèdent cette propriété de captation des protéines plasmatiques.

Les LDL fournissent aux cellules le cholestérol dont elles ont besoin pour la synthèse membranaire lors de leur division, et l'internalisation de ces LDL se fait par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique à haute affinité (Goldstein et Brown, 1977). Les cellules tumorales possèdent également ce mécanisme de captation

des LDL (Simpson *et al.*, 1979). Ho *et al.* (1978) et Vitols *et al.* (1984) ont montré que la captation des LDL était accentuée chez l'homme, dans des cellules leucémiques, et Hynds *et al.* (1984) ont montré le même phénomène dans des tumeurs mammaires de souris. Cette activité élevée des récepteurs à LDL s'explique probablement par le fait que les cellules tumorales étant en division rapide, leur besoin en cholestérol est accentué par rapport à celui des cellules normales (Gal *et al.*, 1981).

1.2. Physiologie tumorale:

L'environnement tumoral extracellulaire est composé de deux éléments: 1) l'espace interstitiel, et 2) la microvasculature irrigant la tumeur. Pour atteindre les cellules tumorales, une molécule doit traverser ces deux structures anatomiques.

1.2.1. L'espace interstitiel tumoral:

Comme dans le cas des tissus normaux, l'espace interstitiel tumoral est composé principalement d'un réseau de collagène et de fibres élastiques. A travers cette structure, on retrouve les fluides interstitiels et des composantes polysaccharidiques (protéoglycane, hyaluronate). Il existe cependant des différences fondamentales entre les concentrations tumorales de ces éléments et les concentrations que l'on retrouve dans les tissus normaux: en général, le compartiment interstitiel tumoral contient des quantités élevées de collagène et des concentrations réduites de protéoglycane et d'hyaluronate, et il est en plus démunie d'un réseau lymphatique bien défini (Jain, 1987). Gullino *et al.* (1965) ont

calculé le volume de l'espace interstitiel de plusieurs tumeurs et ont trouvé qu'en général il était beaucoup plus considérable que l'espace interstitiel des tissus normaux correspondants. Par exemple, dans le cas d'hépatomes, leur espace interstitiel est deux fois plus étendu que celui des tissus hépatiques sains. Appelgren *et al.* (1973) et Bakay (1970) ont obtenu des résultats similaires pour différents sarcomes et des tumeurs cérébrales humaines.

Une fois qu'une molécule a traversé la paroi vasculaire tumorale et se retrouve dans l'espace interstitiel, elle se déplace par deux types de mécanismes: 1) la diffusion, provoquée par un gradient de concentration, et 2) la convection, provoquée par un gradient de pression. Dans l'espace interstitiel tumoral, la diffusion des macromolécules est facilitée grâce à son contenu plus élevé en eau, qui offre moins de résistance au mouvement des macromolécules que l'espace interstitiel plus dense d'un tissu normal (Nugent et Jain, 1984a). Les travaux de Gerlowski et Jain (1986) et de Nugent et Jain (1984b) ont montré une relation entre le contenu en eau de l'espace interstitiel d'un tissu et le coefficient de diffusion de dextrans de différents poids moléculaires à l'intérieur de ce tissu: plus le contenu en eau de l'espace interstitiel est élevé, plus les molécules de dextran diffusent rapidement à l'intérieur. Par contre, le phénomène de convection a plutôt tendance à retarder le transport des macromolécules de la périphérie du compartiment interstitiel au centre de la tumeur. En effet, la pression hydrostatique est généralement plus élevée dans l'espace interstitiel tumoral par rapport à la pression intravasculaire, probablement parce que l'absence de vaisseaux lymphatiques tumoraux bien définis empêche les fluides interstitiels de la région tumorale d'être drainés à l'extérieur, d'où augmentation de la pression interstitielle.

Cela crée un mouvement de convection qui va de l'intérieur de la tumeur à la périphérie de l'espace interstitiel et s'opposant à la diffusion, à l'intérieur de la tumeur, des macromolécules qui traversent la paroi vasculaire tumorale. Swabb *et al.* (1974) ont d'ailleurs démontré que cette pression interstitielle élevée retardait beaucoup le mouvement de différentes macromolécules (IgG, albumine, et autres) à l'intérieur de l'espace interstitiel de plusieurs tumeurs.

1.2.2. Vasculature tumorale:

Les travaux de plusieurs chercheurs ont montré que les vaisseaux sanguins tumoraux étaient plus perméables aux macromolécules que les vaisseaux des tissus normaux environnants. Dewey (1959) montrait déjà qu'un carcinome (Walker 256) accumulait en plus grande quantité, dans son espace extravasculaire, différentes protéines marquées, tandis que Song et Levitt (1971) montraient que la quantité d'albumine marquée à l' ^{125}I retrouvée dans l'espace extravasculaire tumoral était inversement proportionnelle à la taille de la tumeur. O'Connor et Bale (1984) ont démontré quant à eux que les concentrations maximales des [^{125}I]-IgG dans les fluides interstitiels de trois tumeurs chimioinduites chez des rats étaient plus élevées que celles dans les fluides interstitiels de plusieurs tissus sains.

Dvorak *et al.* (1988) et Dvorak (1990) ont identifié, dans des tumeurs de souris et de cobayes, les vaisseaux sanguins tumoraux qui sont hyperperméables: ce sont des veinules et de petites veines, bien différenciées, délimitées par un endothélium continu, et dont les jonctions interendothéliales sont pour la plupart fermées. Les vaisseaux hyperperméables sont pour la plupart localisés à l'interface tumeur-hôte

et dans une bande stromale dispersée entre des nodules tumoraux. Les vaisseaux qui pénètrent à l'intérieur de la tumeur ne présentent pas cette perméabilité élevée aux macromolécules. Le phénomène de fuite vasculaire tumoral ne peut semble-t-il pas être attribué à l'immaturation des vaisseaux, à des défauts structuraux, ou à des espaces entre les cellules endothéliales. Dvorak (1990) a également montré que des traceurs fluorescéine-dextran, qui pénètrent dans l'espace extravasculaire, s'accumulaient plus dans les tumeurs que dans les tissus contrôles, probablement à cause d'une perméabilité plus grande des vaisseaux tumoraux et une élimination diminuée des traceurs, provoquée par l'absence ou l'efficacité moindre du réseau lymphatique tumoral. Il faut noter que les traceurs de hauts poids moléculaires (70-150 kD) qui traversent la vasculature tumorale restent principalement confinés au stroma et entrent très peu en contact avec les cellules malignes, tandis que les traceurs de plus faible poids moléculaire (3 kD) peuvent sortir des vaisseaux qui pénètrent dans la tumeur, des capillaires des tissus normaux, et des vaisseaux hyperperméables, et diffusent librement à travers les tumeurs solides.

1.3. L'environnement cellulaire tumoral:

On a montré que, dans l'environnement de plusieurs types de tumeurs animales provoquées par l'implantation d'allogreffes ou de greffes syngéniques de cellules tumorales, il pouvait y avoir des concentrations élevées de macrophages et autres cellules (lymphocytes T, monocytes) du système immunitaire de l'hôte. Evans (1972) a observé des concentrations de macrophages allant jusqu'à 45 % de la masse tumorale dans des tumeurs de

souris, et jusqu'à 55 % dans des tumeurs de rat. Loveless et Heppner (1983) et Mahoney *et al.* (1983) ont évalué que différentes tumeurs mammaires, chez des souris BALB/c et BALB/cfC₃H, pouvaient contenir jusqu'à 44 % de macrophages. Les macrophages possèdent à leur surface des récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines (Munn *et al.*, 1991). L'interaction IgG-récepteur à Fc est un des signaux qui déclenchent la réponse immunitaire cellulaire à la présence d'une tumeur dans un organisme (Fanger *et al.*, 1989). La présence de grandes quantités de macrophages dans les alvéoles pulmonaires (Levy *et al.*, 1990) peut aussi expliquer la captation élevée des [¹²⁵I]-PIgG par les poumons (Tableau 3). Des études ont également montré, *in vitro* et *in vivo*, que différentes tumeurs de souris pouvaient lier des IgG, non spécifiques, qui forment alors une sorte de couche à la surface des cellules tumorales (Dorval *et al.*, 1976; Witz *et al.*, 1974). Cette fixation des IgG, surtout semble-t-il des IgG2, s'effectue possiblement par l'intermédiaire de récepteurs à Fc (Witz, 1973). Étant donné que, lors de nos expériences de biodistribution animale, nous avons utilisé des immunoglobulines humaines, dirigées contre une tumeur de souris, on est en droit de se demander si l'interaction IgG-récepteur à Fc est alors plausible. Plusieurs études ont néanmoins démontré hors de tout doute que des immunoglobulines provenant d'une espèce animale pouvaient se fixer aux récepteurs à Fc des cellules d'une autre espèce, grâce à la très grande homologie qui peut exister entre les récepteurs à Fc de différents types d'animaux (Haeflner-Cavaillon *et al.*, 1979a et 1979b; Jones *et al.*, 1985; Lubeck *et al.*, 1985; Hibbs *et al.*, 1988).

2. Biodistribution de [¹²⁵I]-BSA, [¹²⁵I]-PIgG, et [¹²⁵I]-LDL:

2.1. $[^{125}\text{I}]$ -BSA:

L'albumine est la principale protéine plasmatique. Malgré cela, sa distribution tissulaire et les sites de son catabolisme restent obscurs. Les résultats obtenus pour la répartition de l'albumine entre l'espace vasculaire et les sites extravasculaires varient beaucoup: Dewey (1959) trouva que, chez le rat, la quantité d'albumine extravasculaire était 1,48 fois plus élevée que la quantité d'albumine vasculaire, tandis que Sellers *et al.* (1966) ont estimé que ce rapport $\text{alb}_{\text{ev}}/\text{alb}_{\text{v}}$ chez le rat était, selon la méthode employée, entre 1,27 et 2,6. Matthews (1957) calcula par différentes techniques le rapport entre l'albumine interstitielle et l'albumine plasmatique chez le rat, et trouva des résultats allant de 0,81 à 2,2. On estime actuellement que, chez un sujet normal, entre 50 % et 70 % de la masse d'albumine corporelle serait extravasculaire (Kaysen, 1988).

On s'accorde généralement pour dire que l'albumine est catabolisée directement du plasma ou dans un compartiment en contact étroit avec lui et avec lequel le plasma échange rapidement ses constituants (McFarlane, 1963). Par contre, la nature des tissus où ce catabolisme a lieu est controversée. Des expériences ont montré, de façon directe ou indirecte, que le tractus gastrointestinal (Armstrong *et al.*, 1960; Katz *et al.*, 1961), le foie (Gordon, 1957; Cohen et Gordon, 1958), les reins (Christensen, 1976; Cortney *et al.*, 1970), et la peau et le muscle (Baynes et Thorpe, 1981), étaient tous des sites de dégradation de l'albumine.

Dans notre cas, si on ne considère que les tissus non-tumoraux, l'albumine se

retrouve surtout dans le sang, les poumons, et les reins (Tableau 6). Par contre, si on exprime la radioactivité en pourcentage absolu de la dose injectée, dans un tissu donné, et non plus en %DI/g de tissu, ce serait alors le sang, la peau, et le muscle, qui capteraient le plus le [125 I]-BSA, étant donné la masse importante de ces deux derniers tissus. Baynes et Thorpe (1981) ont d'ailleurs déterminé que, chez le rat, l'albumine semblait être principalement dégradée par la peau et le muscle. Chez l'humain, l'albumine se retrouverait surtout au niveau de la peau (Rothschild *et al.*, 1955).

2.2. [125 I]-PIgG:

Comme dans le cas de l'albumine, des études cinétiques démontrent que les immunoglobulines gamma doivent être détruites dans une enclave physiologique en équilibre rapide avec l'espace intravasculaire (Waldmann et Strober, 1969). Cependant, ces études n'aident pas à l'identification anatomique du ou des sites de leur dégradation, et elles ne donnent pas d'information quant à savoir si ce catabolisme des IgG s'effectue dans un organe spécifique ou dans un système diffus, comme les cellules du système réticuloendothélial ou de l'endothélium vasculaire (Waldmann et Strober, 1969). Des études ont montré que le petit intestin pouvait être, chez le chien, le site du catabolisme de 38 % des IgG (Andersen *et al.*, 1963), mais Birke *et al.* (1963) n'ont pas observé de perte significative d'IgG dans le tractus gastrointestinal de sujets humains normaux. En utilisant des protéines marquées au ^{51}Cr , au ^{67}Cu , et ^{95}Nb , on a montré que seulement 5 % à 15 % des protéines plasmatiques étaient dégradées dans le tractus gastrointestinal (Waldmann *et al.*, 1967; Waldmann *et al.*, 1969). Les tubules rénaux sont capables

de métaboliser des protéines comme l'hémoglobine et l'albumine (Oliver *et al.*, 1954), mais l'enlèvement des reins chez la souris ne semble pas avoir d'effet sur le catabolisme des IgG (Wochner *et al.*, 1967). Tout porte à croire que les reins contribuent au plus à 15 % de la dégradation des IgG (Waldmann et Strober, 1969). Des expériences faites à l'aide de foies isolés perfusés ont montré que, chez le rat, des quantités d'IgG correspondant à 0,4 % du pool intravasculaire étaient catabolisées chaque heure par cet organe. Cela représente à peu près 30 % du catabolisme total des IgG (Cohen *et al.*, 1962). Le poumon isolé perfusé de lapin peut également cataboliser jusqu'à un certain point les IgG (Askanos et Humphrey, 1958).

Les résultats que nous avons obtenus (Tableau 8) montrent une captation des [125 I]-PIgG surtout par les poumons, les reins, et la rate, et par la peau à partir de 24 heures post-injection. Par contre, en terme de quantités absolues d'activité, et non plus par gramme de tissu, c'est au niveau du muscle et de la peau que les [125 I]-PIgG se retrouvent, si l'on considère la masse totale de ces deux tissus. Chez le rat, Fischman *et al.* (1990) ont montré une captation préférentielle des [111 In]-PIgG dans les reins, le foie, et la rate. Les [125 I]-PIgG sont également la seule des protéines que nous avons utilisées qui s'accumule sur le site tumoral au delà de 48 heures après injection (Tableau 8). La rétention des PIgG dans la tumeur peut s'expliquer par la liaison de leur partie Fc à des cellules du système immunitaire (macrophages, mastocytes) présentes dans l'environnement tumoral, et par la vitesse très lente avec laquelle elles sont éliminées du sang, ce qui favorise leur pénétration et leur séjour prolongés sur le site tumoral.

2.3. $[^{125}\text{I}]$ -LDL:

Les LDL sont des molécules composées d'un centre lipidique et d'une enveloppe hydrophile constituée principalement de l'apoprotéine B-100. Elle servent au transport des phospholipides, des glycérides, et du cholestérol, de leurs sites de synthèse à leurs sites d'utilisation et de dégradation. Les sites du catabolisme des lipoprotéines ne sont pas connus avec précision, mais les cellules du système réticuloendothélial (cellules de Kupffer du foie) seraient impliquées (Stein et Stein, 1967). Plus récemment, des travaux faits avec des LDL marquées avec du $[^{14}\text{C}]$ -sucrose et injectées à des porcs, ont montré que les surrénales, le foie, la rate, et les poumons, étaient les sites principaux de la dégradation des LDL (Pittman *et al.*, 1979). *In vitro*, des cellules parenchymales et des cellules de Kupffer de foie humain sont en mesure de capter et de dégrader les LDL, mais les cellules de Kupffer le font avec une efficacité 18 fois plus élevée (Kamps *et al.*, 1991). Des LDL modifiées peuvent également être internalisées par des macrophages des parois artérielles, menant au développement de l'athérosclérose (Leake et Rankin, 1990). Les expériences faites par Vallabhajosula *et al.* (1988) et Lees *et al.* (1985) dans des lapins montrent que des $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -LDL et des $[^{125}\text{I}]$ -LDL se concentrent surtout, 24 heures après injection, dans les surrénales, le foie, la rate, et les reins.

Nos propres résultats (Tableau 10) indiquent une captation plus élevée des $[^{125}\text{I}]$ -LDL par la rate, le foie, et les poumons, jusqu'à 24 heures post-injection, et ensuite, également par la peau. A 50 heures après injection, c'est dans la rate, le foie, et les reins, que l'on retrouve les concentrations les plus élevées de radioactivité. Il est intéressant de noter que ce sont les $[^{125}\text{I}]$ -LDL qui présentent le

rapport d'activité le plus élevé entre le sang et la tumeur ($3,40 \pm 0,51$, vs $1,39 \pm 0,33$ pour les $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG}$, et $0,89 \pm 0,23$ dans le cas de $[^{125}\text{I}]\text{-BSA}$), ce qui rend les LDL potentiellement plus efficaces dans le contexte de l'imagerie, le contraste entre la tumeur et le pool sanguin étant plus élevé. Cependant, les rapports de l'activité des LDL dans les autres organes sont moins élevés que dans le cas des immunoglobulines et de l'albumine, indiquant une plus faible sélectivité tumorale des LDL; de plus, les lipoprotéines ne montrent pas d'accumulation sur le site tumoral, leur concentration maximale étant atteinte dès le début de l'expérience, à 1 heure post-injection, contrairement aux immunoglobulines, qui s'accumulent de plus en plus sur le site tumoral, caractéristique importante si un porteur doit remplir son rôle d'agent de concentration d'un agent thérapeutique.

3. Cinétique d'élimination de $[^{125}\text{I}]\text{-BSA}$, $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG}$, et $[^{125}\text{I}]\text{-LDL}$:

Si on observe les résultats du tableau 20, on voit que la demi-vie moyenne de $[^{125}\text{I}]\text{-BSA}$ et des $[^{125}\text{I}]\text{-LDL}$, dans les tissus analysés, est beaucoup plus courte que celle des $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG}$. L'élimination d'une protéine d'un tissu est généralement reliée à la concentration plasmatique de cette protéine, puisque les mouvements d'un produit entre les compartiments extra- et intracellulaire sont contrôlés en partie par les lois de diffusion d'un soluté d'un endroit de concentration plus élevée vers un endroit de concentration plus faible. Et comme la demi-vie des $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG}$ dans le sang est de 52,12 heures, comparativement à 11,27 heures pour $[^{125}\text{I}]\text{-BSA}$ et 8,09 heures pour les $[^{125}\text{I}]\text{-LDL}$, le mouvement des $[^{125}\text{I}]\text{-PIgG}$ de l'espace extravasculaire vers le lit vasculaire se trouve de ce fait ralenti.

Dans le cas de [125 I]-BSA, c'est dans la tumeur que ce produit a la plus longue demi-vie, probablement à cause des caractéristiques du métabolisme tumoral et parce que le drainage de l'espace interstitiel tumoral est moins efficace que celui des autres tissus, ceci étant causé par les particularités de la vasculature tumorale. Les demi-vies de [125 I]-BSA dans la peau et le muscle sont également relativement longues, parce que la vitesse des échanges plasmatiques avec ces deux tissus est assez faible.

Pour ce qui est des [125 I]-PIgG, on voit une accumulation de ces protéines dans trois tissus: la peau, le muscle, et la tumeur. Les [125 I]-PIgG sont d'ailleurs le seul des produits marqués qui montre une accumulation nette dans la tumeur entre 1 h et 50 h post-injection, ce qui peut s'expliquer par trois facteurs: 1) la concentration plasmatique des [125 I]-PIgG qui reste assez élevée jusqu'à 50 h post-injection, 2) la liaison possible des IgG, par l'intermédiaire de leur partie Fc, à des cellules du système immunitaire de l'hôte possédant des récepteurs à Fc, où aux cellules tumorales elles-mêmes, et 3) leur dégradation moins rapide que celle des deux autres produits marqués. Il est intéressant de noter la vitesse d'élimination très lente des [125 I]-PIgG du colon ($t_{1/2} = 62,34$ heures), indiquant que le tractus gastrointestinal dégrade ou élimine à un rythme très faible les [125 I]-PIgG ou leurs métabolites.

En ce qui concerne les [125 I]-LDL, leur demi-vie dans tous les tissus est plus faible que pour [125 I]-BSA, sauf dans le foie, la rate, et les reins, qui pourraient être les sites principaux de leur dégradation.

A remarquer également, pour les trois produits marqués, les demi-vies assez

importantes dans les reins, par où sont éliminés beaucoup de produits de dégradation des protéines, en plus de l' ^{125}I libre. On peut aussi relier les demi-vies des trois produits à l'activité du radioisotope dans la thyroïde (Tableau 22 et figure 3), qui concentre sélectivement l'iode. On voit que plus la demi-vie de la protéine marquée dans les souris est courte, plus la radioactivité dans la thyroïde est élevée, indiquant un catabolisme accru de la protéine marquée.

4. Cinétique d'élimination des conjugués [^{125}I]-protéine-ZnPc:

Les conjugués protéine-ZnPc sont éliminés de la circulation sanguine plus rapidement que la ou les protéines natives correspondantes (Tableaux 20 et 21). En plus, ils ne montrent pas une accumulation aussi élevée dans la tumeur (Tableaux 6, 8, 12, 14, 16, et 18, et figure 3). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces phénomènes:

1) La captation accentuée des conjugués par le foie. Jansen *et al.* (1991a) ont montré que l'albumine modifiée chimiquement par de la formaldéhyde et dotée d'une charge négative consiste en deux fractions: une fraction monomérique et une fraction polymérique. Ces deux formes modifiées de l'albumine sont rapidement éliminées de la circulation par les cellules hépatiques. Les cellules endothéliales captent principalement la forme monomérique tandis que les cellules de Kupffer internalisent préférentiellement la forme polymérique. Comme la charge de l'albumine modifiée par le ZnPc devient plus négative (les groupements carboxyles étant déprotonnés à pH physiologique, étant alors sous la forme COO^-) et que des réactions croisées peuvent se produire entre une

molécule de ZnPc, comportant 4 groupements carboxyles, et plusieurs molécules d'albumine, formant ainsi des polymères, un mécanisme de captation du produit par le foie, similaire à celui de la captation de l'albumine modifiée par la formaldéhyde, est envisageable. On remarque d'ailleurs une augmentation de l'activité de [125 I]-BSA-ZnPc dans le foie par rapport à l'albumine native (Tableaux 6 et 12, et figure 3).

Les PlgG modifiés par le ZnPc et les polymères de dextran et de polylysine sont également sujet à la formation d'aggrégats suite aux modifications chimiques auxquelles elles sont soumises. De plus, Nakame *et al.* (1988) et Sako *et al.* (1989) ont observé une élimination très rapide de la circulation de mitomycine conjuguée à des polymères de dextran cationiques. Également, ces conjugués s'accumulent fortement dans le foie, au niveau des cellules parenchymales et non-parenchymales, probablement par l'entremise de forces électrostatiques entre les groupements positifs des dextrans et les charges de surface négatives des cellules hépatiques (potentiel zéta). Cette forte captation cellulaire de molécules polycationiques (polylysine, polyarginine, polyornithine) a d'ailleurs été observée par Ryser (1968) et Ryser et Hancock (1965) sur des cellules en culture, la présence de charges positives multiples sur une molécule accélérant possiblement l'étape de conjugaison avec la membrane cytoplasmique cellulaire menant à l'endocytose de la molécule. Le polymère de polylysine que nous avons utilisé pour la liaison des ZnPc aux PlgG (conjugué [125 I]-PlgG-pl-ZnPc) est chargé positivement (les groupements ϵ -amine des résidus lysine sont principalement sous forme NH_3^+ à pH physiologique (Meister, 1965)), et est donc sujet à ces effets électrophysiologiques. Cependant, la demi-vie et la concentration des [125 I]-PlgG-

pl-ZnPc dans le foie sont moins élevées que celles des [125 I]-PlgG (Tableaux 8, 18, 20, et 21). Par contre, leur activité dans le colon est plus élevée que celle des protéines natives, pouvant indiquer un déversement accru des métabolites dans le tractus gastrointestinal par l'intermédiaire du conduit hépatobiliaire.

Le conjugué [125 I]-PlgG-d-ZnPc, qui a une charge plus négative que les PlgG conjuguées à la polylysine, est possiblement capté par les cellules hépatiques via un mécanisme de liaison des glycoprotéines, le dextran étant un polymère de glucose. Jansen *et al.* (1991b) ont mis en évidence ce mécanisme en étudiant l'interaction, avec des foies isolés perfusés, de sulfate de dextran et d'albumine modifiée par plusieurs types de sucres. Il semble que le mécanisme agisse par l'intermédiaire d'un système de récepteur reconnaissant simultanément les groupements mannose ou d'autres sucres et la présence d'une charge négative sur une molécule.

Comme pour les [125 I]-PlgG-pl-ZnPc, l'activité des [125 I]-PlgG-ZnPc et des [125 I]-PlgG-d-ZnPc dans le colon est plus élevée que celle des [125 I]-PlgG (Tableaux 8, 14, et 16), pouvant indiquer encore une fois l'élimination plus élevée des métabolites de ces produits par le système intestinal.

2) L'augmentation de la masse moléculaire des protéines. Il est bien clair que l'ajout de molécules supplémentaires à l'albumine et aux PlgG provoque un accroissement de leur masse ainsi que de leur dimension moléculaires. Cette augmentation de la masse va de 7200 g/mole pour le [125 I]-BSA-ZnPc à 50 000 g/mole pour les [125 I]-PlgG-pl-ZnPc (en utilisant les résultats indiqués dans le tableau

1). Plus une molécule est grosse, plus elle va avoir de la difficulté à traverser les parois vasculaires qui la séparent de l'espace interstitiel tumoral. Les travaux de Dvorak (1990) ont d'ailleurs démontré cette relation entre poids moléculaire et diffusion dans la région tumorale. Le [125 I]-BSA-ZnPc s'accumule moins dans la tumeur que le [125 I]-BSA (Tableaux 6 et 12), et les trois conjugués des PlgG se concentrent moins dans la région tumorale que les PlgG natives (Tableaux 8, 14, 16, et 18), la concentration maximale dans la tumeur étant proportionnelle à la masse du conjugué (concentration maximale des [125 I]-PlgG-ZnPc dans la tumeur > celle des [125 I]-PlgG-d-ZnPc > celle des [125 I]-PlgG-pl-ZnPc).

3) La charge des conjugués. Comme il a été dit plus haut, un composé qui dispose d'une forte charge positive (comme ici les [125 I]-PlgG-pl-ZnPc) va être rapidement éliminé de la circulation par les cellules hépatiques, diminuant ainsi la quantité du produit disponible pour l'accumulation dans la tumeur. Les molécules chargées négativement, quant à elles, comme les trois autres conjugués, vont être soumises à des forces de répulsion électrostatique créées entre eux et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, pouvant ralentir leur diffusion dans l'espace extravasculaire de la tumeur et d'autres tissus. Khaw *et al.* (1991) ont démontré que l'ajout de groupements fortement chargés négativement pouvait augmenter la captation d'anticorps antimyosine par le tissu infarcté du coeur, puisque la charge négative fait en sorte de diminuer les interactions non-spécifiques de l'anticorps avec d'autres tissus. L'explication en est que la liaison spécifique de l'anticorps avec sa cible est plus forte que les forces de répulsion provoquées par la présence de la charge négative, tandis que cette liaison spécifique ne s'effectue pas avec les autres types de tissus. Il y a alors

augmentation du contraste entre le tissu cible et les autres tissus. Dans notre cas, il n'y a pas de liaison spécifique entre les PlgG et la tumeur, donc la captation des PlgG est diminuée autant au niveau du tissu tumoral que des tissus non-tumoraux. La présence d'une charge négative peut également empêcher les liaisons électrostatiques entre les PlgG et la surface des macrophages tumoraux (Silva Filho *et al.*, 1987; Gorzyca *et al.*, 1989).

4) L'inactivation du site de liaison aux récepteurs à Fc. La présence même des ZnPc et des polymères sur les PlgG peut empêcher la liaison de leur partie Fc aux récepteurs à Fc que l'on retrouve à la surface des cellules tumorales et également des macrophages et autres cellules du système immunitaire qui peuvent se concentrer fortement sur les sites tumoraux. D'ailleurs, le conjugué des PlgG qui se concentre le plus dans la tumeur est le [^{125}I]-PlgG-ZnPc, qui ne comporte pas de polymère intermédiaire entre les ZnPc et les PlgG, et donc dont la partie Fc est la moins encombrée.

5. Scintigraphies gamma:

Les images gamma de la distribution corporelle de [^{131}I]-BSA et des [^{131}I]-PlgG (Figures 5-7) montrent bien la supériorité des immunoglobulines comme agent d'imagerie tumorale. Les scintigraphies confirment d'ailleurs les résultats obtenus à la suite des biodistributions: dans le cas des immunoglobulines, 3 heures après injection, on voit une concentration de la radioactivité au niveau de la cage thoracique (poumons), de la tumeur, et du système urinaire; pour le BSA, à 3 heures post-injection, on remarque que les régions de plus forte activité sont

également les poumons, le système urinaire, et la tumeur; 24 heures après injection, les deux protéines marquées montrent une plus forte concentration au niveau des poumons et de la tumeur, cependant l'activité tumorale des immunoglobulines est visiblement supérieure à celle du BSA. Même 1 semaine après l'injection des [^{131}I]-PIgG, elles se concentrent en quantité élevée dans la tumeur et presque exclusivement dans la tumeur, qu'on distingue très clairement sur les photos, tandis que l'albumine marquée est déjà presque entièrement éliminée de la région tumorale à 24 heures post-injection. D'ailleurs, les études de biodistribution avec les protéines marquées à l' ^{125}I indiquent une concentration maximale de [^{125}I]-BSA dans la tumeur à 6 heures post-injection (Tableau 6 et figure 3), quand les [^{125}I]-PIgG continuent à s'accumuler dans la tumeur même 50 heures après injection (Tableau 8 et figure 3). Par contre, les PIgG marquées au technétium-99m sont moins sélectives pour la tumeur que les [^{131}I]-PIgG (Figures 8 et 9). En effet, 24 heures après injection, les PIgG marquées à l'iode sont concentrées presque uniquement dans la tumeur et le foie (figure 6), tandis que les PIgG marquées au technetium sont localisées surtout dans le foie, les reins, et les viscères, et ne montrent qu'une faible concentration au niveau de la tumeur (figure 8); le citrate de gallium, par contre, se retrouve beaucoup dans le foie et les viscères, mais montre une sélectivité tumorale plus élevée que celle des [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PIgG (figure 8). Ce qui peut expliquer cette différence dans la distribution des PIgG, selon qu'elles sont marquées à l'iode ou au technétium, c'est le processus de marquage lui-même, qui est très différent pour les deux isotopes. Le marquage au technétium est potentiellement plus dénaturant pour les protéines, et il a été montré que les anticorps marqués au technétium s'accumulent plus dans le foie que les anticorps marqués à l'iode (Boyle, 1992). Les [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-PIgG semblent donc

légèrement inférieurs au ^{67}Ga -citrate, l'agent d'imagerie néoplasique le plus utilisé en clinique, pour la détection de la tumeur MAC que nous avons étudiée.

6. Marquage des protéines et stabilité des produits marqués *in vivo*:

Lors du marquage des protéines, les conditions peuvent être assez différentes d'une protéine à l'autre, en termes de quantités d'iodogen utilisées, de quantités de protéines, et de quantités de radioisotope (Tableaux 2 et 3), ce qui provoque des activités spécifiques variables d'un produit à l'autre (Tableaux 4 et 5). On doit bien réaliser que les résultats de biodistribution sont exprimés en fonction d'un pourcentage de dose injectée (%DI), ce qui fait que les variations dans les activités spécifiques des produits sont sans importance. Dans le cas des protéines marquées à l'iode, les taux de marquage étant relativement faibles ($< 10^{-1}$ atome d'iode par molécule de protéine, calculé d'après Oliver, 1971), les produits qui sont plus fortement marqués ne risquent pas de voir leur distribution ni leur dégradation affectées par la présence d'iode, qui commence à influencer la cinétique de catabolisme des protéines à des concentrations supérieures à 0,2 atome par molécule de protéine (Divgi et Larson, 1989; Ferens *et al.*, 1984).

Dans l'analyse de tous les résultats obtenus (biodistributions et scintigraphies), nous partons du principe que la radioactivité détectée *in vivo* correspond à celle du marqueur lié aux différents produits étudiés. ■ est bien important de noter qu'une partie de cette radioactivité est générée par des fragments des protéines marquées auxquels est toujours lié le radioisotope, ou par le radioisotope lui-même, séparé du produit marqué. Dans le cas des protéines marquées à l'iode

particulièrement, des enzymes de déhalogénéation (déiodinases) seraient responsables du détachement du marqueur radioactif de la protéine (Zalutsky et Narula, 1987). Dewey (1959) a estimé à environ 10 %, lors d'expériences de biodistribution de protéines plasmatiques marquées, la proportion d'iode qui se trouve dans le pool sanguin sous forme d'iode libre. Une bonne estimation du degré de dégradation des protéines marquées est toutefois donné par la concentration d'iode radioactif dans la thyroïde (tableaux 22 et 23), organe qui capte la majeure partie de l'iode libre.

Conclusion

Des trois protéines que nous avons marquées à l' ^{125}I (BSA, PlgG, et LDL), les PlgG sont celles qui montrent la plus grande sélectivité tumorale dans le modèle animal que nous avons utilisé. Les PlgG marquées à l' ^{131}I sont également plus efficaces que le ^{131}I -BSA pour la visualisation scintigraphique de la même tumeur. Cependant, les PlgG marquées au technétium perdent une partie de leur sélectivité tumorale par rapport aux ^{131}I -PlgG. Également, les études d'imagerie ont montré une sélectivité tumorale légèrement plus grande du citrate de ^{67}Ga , l'agent de référence pour la détection clinique de tumeurs, par rapport aux $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PlgG. Il faudrait donc développer des méthodes de marquage au technétium qui soient plus douces, dénaturant moins les PlgG, puisque le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est un radioisotope presque idéal pour la médecine nucléaire (demi-vie courte de 6 heures, énergie d'émission gamma optimale pour l'imagerie, et obtention sur place grâce à des générateurs cliniques ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$). Quant à l'utilisation des PlgG pour le transport et le ciblage de phtalocyanines, elle est prometteuse si on obéit à certaines règles: l'emploi de polymères de sucres ou chargés positivement pour la conjugaison des photosensibilisateurs aux immunoglobulines est à proscrire, étant donné qu'ils provoquent la captation accélérée des conjugués par le foie et leur élimination très rapide de la circulation, diminuant ainsi les quantités de produit atteignant la tumeur; les techniques chimiques de liaison des phtalocyanines aux PlgG doivent dénaturer le moins possible les protéines, et ne doivent pas former de polymères ou d'aggrégats, qui sont captés rapidement par le système hépatique; la liaison des phtalocyanines doit également s'effectuer

aussi loin que possible de la partie Fc des PlgG, possiblement responsable de leur accumulation sur les sites tumoraux.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. van Lier pour m'avoir permis de mener à bien ces travaux, et pour la remarquable latitude qu'il m'a accordée tout au long de la réalisation de ce projet.

Je veux également souligner la très agréable atmosphère et le climat la plupart du temps détendu et stimulant qui ont régnés dans le laboratoire pendant les (presque) 3 années que j'y ai passées, tout cela grâce aux merveilleux gens que j'ai eu la chance de côtoyer.

Merci tout particulièrement à Jacques (Jack) Rousseau et à René Ouellet(te), l'un pour m'avoir initié aux rudiments de l'art ô combien subtil de l'expérimentation animale, l'autre pour le temps qu'il a bien voulu consacrer à la synthèse de plusieurs des produits utilisés lors des présents travaux.

Je ne pourrai jamais me montrer assez reconnaissant envers le Dr. Darel Hunting, pour m'avoir, par sa simple présence, permis de développer de grandes qualités, telles que la patience, la tolérance, et le contrôle de soi.

Merci au même Darel ainsi qu'au Dr. Brian Talbot pour avoir accepté la périlleuse mission d'arbitrer mon mémoire. Leur expertise ne l'aura rendu que meilleur.

Je remercie enfin du fond de mon coeur, même s'il est de pierre, Zab, responsable autant que moi de la mise bas de mon rejeton scientifique. Sans elle, j'aurai craqué.

Par contre, je ne tiens pas du tout à remercier: les impôts, la récession, Claude Morin, George Bush,...

Bibliographie

Abelev, G.I.: Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors, *Adv. Cancer Res.*, 14:295-358, 1971

Abrams, M.J.: Small coordination complexes in tumor imaging, *J. Nucl. Med.*, 32:5:849-850, 1991

Aizawa, K., Kato, H., Ono, J., Konaka, C., Kawate, N., Yoneyama, K., Otawa, M., Shinohara, H., Saito, M., Takahashi, H.: A new diagnostic system for malignant tumors using hematoporphyrin derivative, laser photoradiation and a spectroscope. Dans: *Porphyrin localization and treatment of tumors*, Doiron, D., Gomer, C.J., éditeurs, Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 227-238

Allen, C., Hogg, N.: Monocytes and other infiltrating cells in human colorectal tumours identified by monoclonal antibodies, *Immunology*, 55:289, 1985

Andersen, S.B., Glenert, J., Wallevik, K.: Gammaglobulin turnover and intestinal degradation of gammaglobulin in the dog, *J. Clin. Invest.*: 42:1873-1881, 1963

Appelgren, L., Peterson, H.I., Rosengren, B.: Vascular and extravascular spaces in two transplantable tumors of the rat, *Bibl. Anat.*, 12:504-510, 1973

Armstrong, F., Margen, S., Tarver, H.: Plasma protein VII. Site of degradation of serum albumin, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 103:592-596, 1960

Askanos, B.A., Humphrey, J.H.: Formation of antibody by isolated perfused lungs

of immunized rabbits. The use of C¹⁴-amino acids to study the dynamics of antibody synthesis, *Biochem. J.*, 70:212-222, 1958

Bakay, L.: The extravascular space in brain tumors. I. Morphological considerations, *Brain*, 93:693-698, 1970

Balchum, O.J., Doiron, D.R., Huth, G.C.: HpD photodynamic therapy for obstructing lung cancer. Dans: Porphyrin localization and treatment of tumors, Doiron, D., Gomer, C.J., éditeurs, Alan R. Liss, New York, 1984, pp-727-745

Barr, H., Tralau, C.J., Boulos, P.B., MacRobert, A.J., Krasner, N., Phillips, D., Bown, S.G.: Selective necrosis in dimethylhydrazine induced rat colon tumors using phthalocyanine photodynamic therapy, *Gastroenterol.*, 98:6:1532-1537, 1990

Baynes, J.W., Thorpe, S.R.: Identification of the sites of albumin catabolism in the rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206:2:372-379, 1981

Birke, G., Liljedahl, S.O., Olhagen, B., Plantin, L.O., Ahlinder, S.: Catabolism and distribution of gammaglobulin. A preliminary study with ¹³¹I-labelled gammaglobulin, *Acta Med. Scand.*, 173:589-603, 1963

Boyle, C.C., Paine, A.J., Mather, S.J.: The mechanism of hepatic uptake of a radiolabelled monoclonal antibody, *Int. J. Cancer*, 50:912-917, 1992

Bradwell, A.R., Fairweather, D.S., Dykes, P.W., Keeling, A., Vaughan, A., Taylor, J.: Limiting factors in the localization of tumours with radiolabelled antibodies, *Immunol. Today*, 6:5:163-170, 1985

Brasseur, N., Ali, H., Langlois, R., van Lier, J.E.: Biological activities of

phthalocyanines IX. Photosensitization of V-79 chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines, Photochem. Photobiol., 47:705-711, 1988

Bush, H., Fujiwara, E., Firszt, D.C.: Studies on the metabolism of radioactive albumin in tumor-bearing rats, Cancer Res., 21:371-377, 1961

Chan, W.S., MacRobert, A.J., Phillips, D., Hart, I.R.: Use of charge coupled device camera for imaging of intracellular phthalocyanines, Photochem. Photobiol., 50:5:617-624, 1989

Chan, W.S., Marshall, J.F., Lam, G.Y.F., Hart, I.R.: Tissue uptake, distribution, and potency of the photoactivable dye chloraluminum sulfonated phthalocyanine in mice bearing transplantable tumors, Cancer Res., 48:3040-3044, 1988

Christensen, E.I.: Rapid protein uptake and digestion in proximal tubule lysosomes, Kidney Int., 10:301-310, 1976

Christensen, H.N., Henderson, M.E.: Comparative uptake of free amino acids by mouse-ascites carcinoma cells and normal tissues, Cancer Res., 12:229-231, 1952

Christensen, H.N., Riggs, T.R.: Concentrative uptake of amino acids by the ehrlich mouse ascites carcinoma cell, J. Biol. Chem., 194:57-68, 1952

Cohen, S., Gordon, A.H.: Catabolism of plasma albumin by the perfused rat liver, Biochem. J., 70:544-551, 1958

Cohen, S., Gordon, A.H., Matthews, C.: Catabolism of γ -globulin by the isolated perfused rat liver, Biochem. J., 82:197-205, 1962

Cohen, S., Belser, S.M., Hsu, K.C.: Immunohistochemical study of the uptake of serum proteins by neoplastic liver cells, *Cancer Res.*, 21:1510-1512, 1961

Cortney, M.A., Sawin, L.L., Weiss, D.D.: Renal tubular protein absorption in the rat, *J. Clin. Invest.*, 49:1-4, 1970

Cullen, K.J., Stevens, D.P., Frost, M.A., MacKay, I.R.: Carcinoembryonic antigen (CEA), smoking, and cancer, in a longitudinal population study, *Aust. NZ J. Med.*, 6:279-283, 1976

Dewey, W.C.: Vascular-extravascular exchange of ^{131}I plasma proteins in the rat, *Am. J. Physiol.*, 197:423-431, 1959

Divgi, C.R., Larson, S.M.: Radiolabeled monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of malignant melanoma, *Semin. Nucl. Med.*, 19:4:252-261, 1989

Dorval, G., Witz, I.P., Klein, E., Wigzell, H.: Tumor-bound immunoglobulins. I. Further analysis of the characteristics of binding of immunoglobulins to *in vivo*-grown tumor cells, *Int. J. Cancer*, 17:109-119, 1976

Dougherty, T.J.: The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. Dans: Porphyrin localization and treatment of tumors, Doiron, D., Gomer, C.J., éditeurs, Alan R. Liss, New York, 1984, pp.301-314

Dougherty, T.J., Weishaupt, K.R., Boyle, D.G.: Photodynamic sensitizers. Dans: *Cancer. Principles and practice of oncology*, 2nd edition, De Vita, Jr., V.T., et al, éditeurs, J.B. Lippincott Company, Philadelphie, 1985, pp.2272-2279

Dvorak, H.F.: Leaky tumor vessels: consequences for tumor stroma generation and

for solid tumor therapy, *Progress Clin. Biol. Res.*, 354A:317-330, 1990

Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T., Dvorak, A.M.: Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules, *Am. J. Pathol.*, 133:1:95-109, 1988

Early, P.J., Sodee, D.B., Abdel Razzak, M.: Textbook of nuclear medicine technology, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1979, p.269

Edwards, C.L. Hayes, R.L.: Tumor scanning with ⁶⁷gallium citrate, *J. Nucl. Med.*, 10:103-105, 1969

Ehrlich, P.: dans: Collected studies on immunity, Willey, New York, 1906, pp.442-447

Evans, R.: Macrophages in syngeneic animal tumours, *Transplantation*, 14:4:468-473, 1972

Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F., Guyre, P.M.: Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG, *Immunol. Today*, 10:3:92-99, 1989

Ferens, J.M., Krohn, K.A., Beaumier, P.L., Brown, J.P., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Carrasquillo, J.A., Larson, S.M.: High-level iodination of monoclonal antibody fragments for radiotherapy, *J. Nucl. Med.*, 25:367-370, 1984

Fischman, A.J., Rubin, R.H., White, J.A., Locke, E., Wilkinson, R.A., Nedelman, M., Callahan, R.J., Khaw, B.A., William Strauss, W.: Localization of Fc and Fab fragments of non specific polyclonal IgG at focal sites of inflammation, *J. Nucl. Med.*, 31:7:1199-1205, 1990

Fleischman, J., Catalona, W.J., Fair, W.R., Heston, W.D.W., Menon, M.: Lack of

value of radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase as a screening test for prostatic cancer in patients with obstructive prostatic hyperplasia, *J. Urol.*, 129:312-314, 1983

Foote, C.S.: Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. Dans: *Free radicals in biology*, Vol. II, Pryor, W.A., éditeur, Academic Press, New York, 1976, pp. 85-133

Fujii, H., Hashimoto, T., Nakamura, K., Sanmiya, T., Shimizu, S., Okuyama, Y., Hasegawa, T., Kubo, A., Kinoshita, F., Hashimoto, S.: Tumor imaging using ^{99m}Tc -hexamethyl propyleneamine oxime, *Jap. J. Nucl. Med.*, 27:3:249-260, 1990

Gal, D., Ohashi, M., MacDonald, P.C., Buchsbaum, H.J., Simpson, E.R.: Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 139:877-885, 1981

Gerlowski, L.E., Jain, R.K.: Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues, *Microvasc. Res.*, 31:288-305, 1986

Ghose, T., Nairn, R.C., Fothergill, J.E.: Uptake of proteins by malignant cells, *Nature*, 196:1108-1109, 1962

Girotti, A.W.: Photodynamic lipid peroxidation in biological systems, *Photochem. Photobiol.*, 51:497-509, 1990

Glassberg, E., Lewandowski, L., Lask, G., Uitto, J.: Laser-induced photodynamic therapy with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate as the photosensitizer: differential phototoxicity in normal and malignant tumor cells *in*

vitro, J. Invest. Dermatol., 94:5:604-610, 1990

Gold, P., Freedman, S.O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system, J. Exp. Med., 122:467-481, 1965

Goldstein, J.L., Brown, M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis, Ann. Rev. Biochem., 46:897-930, 1977

Gordon, A.H.: The use of the isolated perfused liver to detect alterations to plasma proteins, Biochem. J., 66:255-264, 1957

Gorzyca, W., Wieczorek, Z., Lisowski, J.: Cell surface sialic acid affects immunoglobulin binding to macrophages, FEBS Lett., 259:1:99-102, 1989

Greer, S., Santos, O., Gottlieb, C., Schwade, J., Marion, H.S.: 5-chlorodeoxycytidine, a radiosensitizer effective against RIF-1 and Lewis lung carcinoma, is also effective against a DMBA-induced mammary adenocarcinoma and the EMT-6 tumor in BALB/c mice, Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 22:3:505-510, 1992

Gullino, P.M., Grantham, F.H., Smith, S.H.: The interstitial water space of tumors, Cancer Res., 25:727-731, 1965

Haefner-Cavaillon, N., Klein, M., Dorrington, K.J.: Studies on the Fc receptor of the murine macrophage-like cell line P388D₁. I- The binding of homologous and heterologous immunoglobulin G, J. Immunol., 123:5:1905, 1979a

Haefner-Cavaillon, N., Dorrington, K.J., Klein, M.: Studies on the Fcγ receptor of the murine macrophage-like cell line P388D₁. II- Binding of human IgG subclass proteins and their proteolytic fragments, J. Immunol., 123:5:1914, 1979b

Henderson, J.F., Lepage, G.A.: Utilization of host protein by 6C3HED ascites lymphosarcoma in C3H and Swiss mice, *Cancer Res.*, 19:749-756, 1959

Henderson, B.W., Dougherty, T.J., Malone, P.B.: Studies on the mechanism of tumor destruction by photoradiation therapy. Dans: Porphyrin localization and treatment of tumors, Doiron, D., Gomer, C.J., éditeurs, Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 301-314

Hibbs, M.L., Bonadonna, L., Scott, B.M., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M.: Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2240, 1988

Ho, Y.K., Graham Smith, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L.: Low density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemic cells, *Blood*, 52:1099-1114, 1978

Hynds, S.A., Welsh, J., Stewart, J.M., Jack, A., Soukop, M., McArdle, C.S., Calman, K.C., Packard, C.J., Shepherd, J.: Low-density lipoprotein metabolism in mice with soft tissue tumours, *Biochim. Biophys. Acta*, 795:589-595, 1984

Jain, R.K.: Determinants of tumor blood flow: a review, *Cancer Res.*, 48:2641-2658, 1988

Jain, R.K.: Transport of molecules in the tumor interstitium: a review, *Cancer Res.*, 47:3039-3051, 1987

Jansen, R.W., Molema, G., Harms, G., Kruitj, J.K., van Berkel, T.J., Hardonk, M.J., Meijer, D.K.: Formaldehyde treated albumin contains monomeric and polymeric forms that are differently cleared by endothelial and kupffer cells of the

liver: evidence for scavenger receptor heterogeneity, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 180:1:23-32, 1991a

Jansen, R.W., Molema, G., Ching, T.L., Oosting, R., Harms, G., Moolenaar, F., Hardonk, M.J., Meijer, D.K.F.: Hepatic endocytosis of various types of mannose-terminated albumins. What is important, sugar recognition, net charge, or the combination of these features, *J. Biol. Chem.*, 266:5:3343-3348, 1991b

Jiang, F.N., Jiang, S., Liu, D., Richter, A., Levy, J.G.: Development of technology for linking photosensitizers to a model monoclonal antibody, *J. Immunol. Methods*, 134:139-149, 1990

Jones, D.H., Looney, R.J., Anderson, C.L.: Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength, *J. Immunol.*, 135:5:3348, 1985

Jori, G., Reddi, E., Cozzani, I., Tomio, L.: Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumour-bearing mice, *Br. J. Cancer*, 53:615-621, 1986

Kamps, J.A., Kruijt, J.K., Kuiper, J., van Berkel, T.J.C.: Uptake and degradation of human low-density lipoprotein by human liver parenchymal and Kupffer cells in culture, *Biochemical J.*, 276:1:135-140, 1991

Katz, J., Rosenfeld, S., Sellers, A.L.: Sites of plasma albumin catabolism in the rat, *Am. J. Physiol.*, 200:6:1301-1306, 1961

Kaysen, G.A.: Albumin metabolism in the nephrotic syndrome: the effect of dietary protein intake, *Am. J. Kidney Diseases*, 12:6:461-480, 1988

- Kessel, D.:** Intracellular localization of a chalcogenapyrylium dye probed by spectroscopy and sites of photodamage, *Photochem. Photobiol.*, 53:1:73-76, 1991
- Kessel, D., Beck, W.T., Kukuruga, D., Schulz, V.:** Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes, *Cancer Res.*, 51:17:4665-4670, 1991
- Kessel, D., Schulz, V.:** Sites of photosensitization by protoporphyrin and tin protoporphyrin in leukemia L1210 cells, *J. Photochem. Photobiol.*, 6:1-2:87-92, 1990
- Kessel, D., Thompson, P., Satio, K., Nantwi, K.D.:** Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine, *Photochem. Photobiol.*, 45:787-790, 1987
- Kessel, D.:** Hematoporphyrin and HPD: photochemistry and phototherapy, *Photochem. Photobiol.*, 39:851-859, 1984
- Khaw, B.-A., Klibanov, A., O'Donnell, S.M., Saito, T., Nossiff, N., Slinkin, M.A., Newell, J.B., William Strauss, H., Torchilin, V.P.:** Gamma imaging with negatively charge-modified monoclonal antibody: modification with synthetic polymers, *J. Nucl. Med.*, 32:9:1742-1751, 1991
- Kohler, G., Milstein, C.:** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity, *Nature*, 256:495-497, 1975
- Kurzer, M. Meguid, M.M.:** Cancer and protein metabolism, *Surg. Clin. North Am.*, 66:969-1001, 1986
- Labib, A., Lenaerts, V., Chouinard, F., Leroux, J.C., Ouellet, R., van Lier, J.E.:** Biodegradable nanospheres containing phthalocyanines and

naphthalocyanines for targeted photodynamic tumor therapy, *Pharmaceut. Res.*, 8:8:1027-1031, 1991

Leake, D.S., Rankin, S.M.: The oxidative modification of low-density lipoproteins by macrophages, *Biochem. J.*, 270:3:741-748, 1990

Lees, R.S., Garabedian, H.D., Lees, A.M., Schumacher, D.J., Miller, A., Isaacsohn, J.L., Derksen, A., William Strauss, H.: Technetium-99m low density lipoproteins: preparation and biodistribution, *J. Nucl. Med.*, 26:9:1056-1062, 1985

Levy, P.C., Looney, R.J., Shen, L., Graziano, R.F., Fanger, M.W., Roberts, N.J. Jr, Ryan, D.H., Utell, M.J.: Human alveolar macrophage FcR-mediated cytotoxicity. Heteroantibody- versus conventional antibody-mediated target cell lysis, *J. Immunol.*, 144:10:3693-3700, 1990

Lin, C.W., Bellnier, D.A., Fujime, M., Prout, G.R. Jr: HpD photodetection of bladder carcinoma. Dans: Porphyrin localization and treatment of tumors, Doiron, D., Gomer, C.J., éditeurs, Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 187-199

Loveless, S.E., Heppner, G.H.: Tumor-associated macrophages of mouse mammary tumors. I. Differential cytotoxicity of macrophages from metastatic and non metastatic tumors, *J. Immunol.*, 131:4:2074-2078, 1983

Lubeck, M.D., Steplewski, Z., Baglia, F., Klein, M.H., Dorrington, K.J., Koprowski, H.: The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors, *J. Immunol.*, 135:2:1299

Mahoney, K.H., Fulton, A.M., Heppner, G.H.: Tumor-associated macrophages of mouse mammary tumors. II. Differential distribution of macrophages from

metastatic and non metastatic tumors, J. Immunol., 131:4:2079-2085, 1983

Martin Negri, R., Zalts, A., San Roman, E.A., Aramendia, P.F., Braslavsky, S.E.: Carboxylated zinc-phthalocyanine, influence of dimerization on the spectroscopic properties. An absorption, emission, and thermal lensing study, Photochem. Photobiol., 53:3:317-322, 1991

McFarlane, A.S.: Catabolism of plasma proteins, The Lancet, 1:131-132, 1963

Meister, A.: Biochemistry of the amino acids, Academic Press, New York, 1965, p.28

Mew, D., Wat, C.-K., Towers, G.H.N., Levy, J.G.: Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates, J. Immunol., 130:3:1473-1477, 1983

Mider, B.G.: Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects: a review, Cancer Res., 11:11:821-829, 1951

Morgan, J., Gray, A.G., Huehns, E.R.: Specific targeting and toxicity of sulphonated aluminum phthalocyanine photosensitized liposomes directed to cells by monoclonal antibody *in vitro*, Br. J. Cancer, 59:366-370, 1989

Munn, D.H., McBride, M., Cheung, N.-K.V.: Role of low-affinity Fc receptors in antibody-dependant tumor cell phagocytosis by human monocyte-derived macrophages, Cancer Res., 51:4:1117-1123, 1991

Nakame, S., Matsumoto, S., Takakura, Y., Hashida, M., Sezaki, H.: The accumulation mechanism of cationic mitomycin C-dextran conjugates in the liver: in-vivo cellular localization and in-vitro interaction with hepatocytes, J. Pharm.

Pharmacol., 40:1-6, 1988

Nugent, L.J., Jain, R.K.: Pore and fiber-matrix models for diffusive transport in normal and neoplastic tissues, *Microvasc. Res.*, 28:270-274, 1984

Nugent, L.J., Jain, R.K.: Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues, *Cancer Res.*, 44:238-244, 1984

O'Connor, S.W., Bale, W.F.: Accessibility of circulating immunoglobulins G to the extravascular compartment of solid rat tumors, *Cancer Res.*, 44:3719-3723, 1984

Oliver, J., MacDowell, M., Lee, Y.C.: Cellular mechanisms of protein metabolism in the nephron. I. The structural aspects of proteinuria; tubular absorption; droplet formation and the disposal of proteins, *J. Exp. Med.*, 99:589-604, 1954

Oliver, R.: Principles of the use of radio-isotope tracers in clinical and research investigations, Pergamon Press, 1971, p.13

Orihashi, Y., Yamamura, K., Oshima, N.: Effect of substituents on the oxidation potential of phthalocyanines and electrocrystallization, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 60:3731-3738, 1987

Paquette, B., Boyle, R.W., Ali, H., MacLennan, A.H., Truscott, T.G., van Lier, J.E.: Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: the effect of hydrophobic substituents on the *in vitro* phototoxicity of phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.*, 53:3:323-327, 1991

Pittman, R.C., Attie, A.D., Carew, T.E., Steinberg, D.: Tissue sites of degradation of low density lipoprotein: Application of a method for determining the fate

of plasma proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:10:5345-5349, 1979

Quinn, P.K., Bibby, M.C., Cox, J.A., Crawford, S.M.: The influence of hydralazine on the vasculature, blood perfusion and chemosensitivity of MAC tumours, Br. J. Cancer, 66:2:323-330, 1992

Reddi, E., Zhou, C., Biolo, R., Menegaldo, E., Jori, G.: Liposome- or LDL-administered Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency, Br. J. Cancer, 61:407-411, 1990

Rihter, B.D., Bohorquez, M.D., Rodgers, M.A., Kenney, M.E.: Two new sterically hindered phthalocyanines: synthetic and photodynamic aspects, Photochem. Photobiol., 55:5:677-680, 1992

Roberts, J.C., Figard, S.D., Mercer-Smith, J.A., Svitra, Z.V., Anderson, W.L., Lavallee, D.K.: Preparation and characterization of copper-67 porphyrin-antibody conjugates, J. Immunol. Methods, 105:153-164, 1987

Rosenthal, I., Ben-Hur, E.: Phthalocyanines in photobiology. Dans: Phthalocyanines. Properties and applications. Leznoff, C.C., Lever, A.B.P., éditeurs, VCH Publishers, Inc., New York, 1989, pp. 397-425

Rothschild, M.A., Bauman, A., Yalow, R.S., Berson, S.A.: Tissue distribution of I^{131} labeled human serum albumin following intravenous administration, J. Clin. Invest., 34:1334-1358, 1955

Rousseau, J., Langlois, R., Ali, H., van Lier, J.E.: Biological activities of phthalocyanines XII. Synthesis tumor uptake and biodistribution of ^{14}C -labeled

disulfonated and trisulfonated gallium phthalocyanine In C3H mice, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 6:121-132, 1990

Ryser, H.J.-P.: Uptake of protein by mammalian cells: an underdeveloped area, Science, 159:390-396, 1968

Ryser, H.J.-P., Hancock, R.: Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture, Science, 150:501-503, 1965

Sako, K., Itakura, K., Nishida, K., Takakura, Y., Hashida, M., Sezaki, H.: Disposition of a polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate, in the perfused rat liver, J. Pharmaceut. Sci., 78:1:11-16, 1989

Sands, H.: Experimental studies of radioimmunodetection of cancer: an overview, Cancer Res. (suppl.), 50:809s-813s, 1990

Sauer, L.A., Stayman III, J.W., Dauchy, R.T.: Amino acid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumors, Cancer Res., 42:4090-4097, 1982

Shapot, V.S.: On the multiform relationships between the tumor and the host, Adv. Cancer Res., 30:89-150, 1979

Silva-Filho, F.C., Santos, A.B.S., de Carvalho, T.M.U., de Souza, W.: Surface charge of resident, elicited and activated mouse peritoneal macrophages, J. Leukocyte Biol., 41:143-149, 1987

Simpson, E.R., Bilheimer, D.W., MacDonald, P.C., Porter, J.C.: Uptake and degradation of plasma lipoproteins by human choriocarcinoma cells in culture, Endocrinology, 104:1:8-16, 1979

- Song, C.W., Levitt, S.H.:** Quantitative study of vascularity in Walker carcinoma 256, *Cancer Res.*, 31:587-589, 1971
- Spikes, J.D.:** Yearly review. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors, *Photochem. Photobiol.*, 43:6:691-699, 1986
- Stein, O., Stein, Y.:** The role of the liver in the metabolism of chylomicrons, studied by electron microscopic autoradiography, *Lab. Invest.*, 17:4:436-446, 1967
- Swabb, E.A., Wei, J., Gullino, P.M.:** Diffusion and convection in normal and neoplastic tissues, *Cancer Res.*, 34:2814-2822, 1974
- Teicher, B.A., Herman, T.S., Tanaka, J., Eder, J.P., Holden, S.A., Buble, G., Coleman, C.N., Frei III, E.:** Modulation of alkylating agents by etanidazole and Fluosol-DA/carbogen in the FSa1C fibrosarcoma and EMT-6 mammary carcinoma, *Cancer Res.*, 51:4:1086-1091, 1991
- Tralau, C.J., MacRobert, A.J., Coleridge-Smith, P.D., Barr, H., Bown, S.G.:** Photodynamic therapy with phthalocyanine sensitization: quantitative studies in a transplantable rat fibrosarcoma, *Br. J. Cancer*, 55:389-355, 1987
- Vallabhajosula, S., Paidi, M., Badimon, J.J., Le, N.-A., Goldsmith, S.J., Fuster, V., Ginsberg, H.N.:** Radiotracers for low density lipoprotein biodistribution studies *In vivo*: Technetium-99m low density lipoprotein versus radioiodinated low density lipoprotein preparations, *J. Nucl. Med.*, 29:7:1237-1245, 1988
- van Leengoed, H.L., van der Veen, N., Versteeg, A.A., van der Berg-Blok, A.E., Marijnissen, J.P., Star, W.M.:** Tumour tissue imaging using the localizing properties

and fluorescence of some phthalocyanines, *Int. J. Rad. Biol.*, 60:1-2:121-124, 1991

Vitols, S., Gahrton, G., Ost, A., Peterson, C.: Elevated low density lipoprotein receptor activity in leukemic cells with monocytic differentiation, *Blood*, 63:1186-1193, 1984

Waldmann, T.A., Strober, W.: Metabolism of immunoglobulins, *Prog. Allergy*, 13:1-110, 1969

Waldmann, T.A., Wochner, R.D., Strober, W.: The role of the gastrointestinal tract in plasma protein metabolism: studies with ⁵¹Cr-albumin, *Am. J. Med.*, 46:275-285, 1969

Waldmann, T.A., Morell, A.G., Wochner, R.D., Strober, W., Sternlieb, I.: Measurement of gastrointestinal protein loss using ceruloplasmin labeled with 67-Copper, *J. Clin. Invest.*, 46:10-20, 1967

Wiseman, G., Ghadially, F.N.: A biochemical concept of tumour growth, infiltration, and cachexia, *Br. Med. J.*, 2:18-21, 1955

Witz, I.P., Kinamon, S., Ran, M., Klein, G.: Tumour-bound immunoglobulins. The *in vitro* fixation of radioiodine-labelled anti-immunoglobulins reagents by tumour cells, *Clin. Exp. Immunol.*, 16:321-333, 1974

Witz, I.P.: The biological significance of tumor-bound immunoglobulins, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 61:151-171, 1973

Wochner, R.D., Strober, W., Waldmann, T.A.: The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones proteins and immunoglobulins fragments, *J. Exp.*

Med., 126:207-221, 1967

Yokoyama, A., Hata, N., Horiuchi, K., Masuda, H., Saji, H., Ohta, H., Yamamoto, K., Endo, K., Torizuka, K.: The design of a pentavalent Tc-99m-dimercaptosuccinate complex as a tumor imaging agent, *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 12:273-279, 1985

Zalutsky, M.R., Narula, A.S.: A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine, *Appl. Radiat. Isot.*, 38:1051-1055, 1987

Annexe

Calcul de la demi-vie des produits marqués dans les tissus de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6.

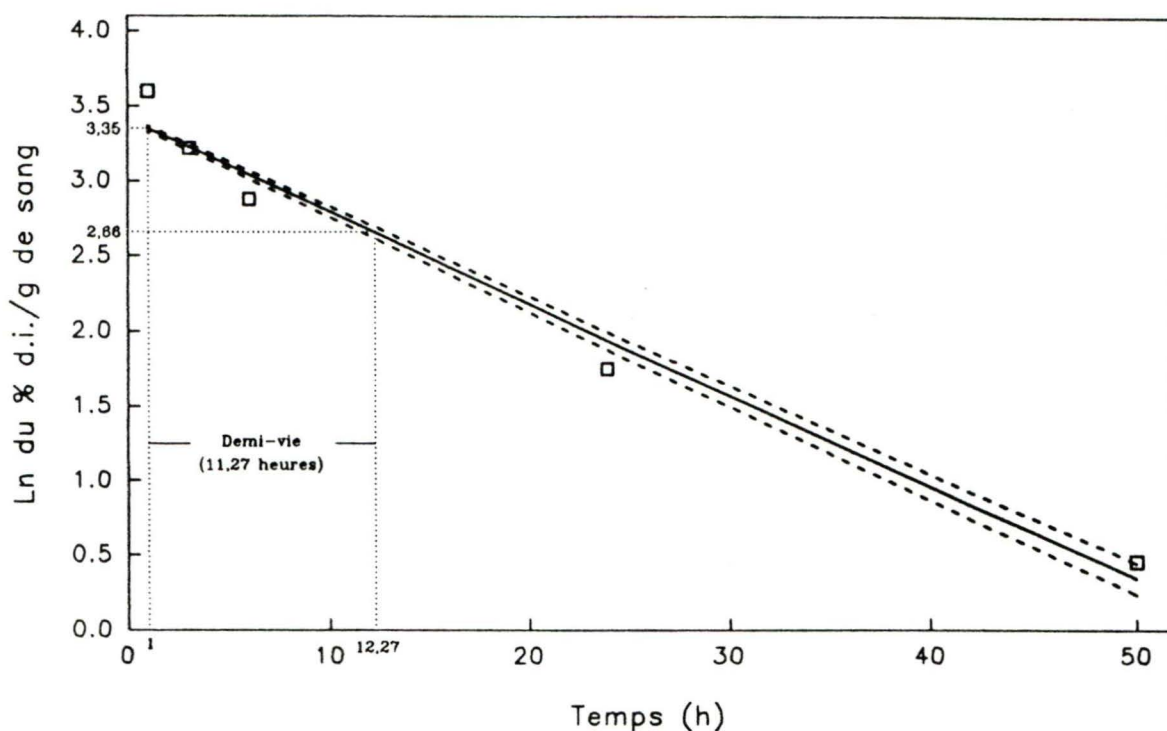


FIGURE 10. Calcul de la demi-vie de $[^{125}\text{I}]$ -BSA dans le sang de souris BALB/c portant des tumeurs EMT-6. Les résultats expérimentaux (carrés) ont été disposés sous forme logarithmique (Ln: logarithme naturel), et après qu'une droite ait été tracée à travers les points suite à une analyse de régression linéaire, le temps correspondant à une diminution de moitié (ou un doublement) de l'activité dans le tissu a été déterminé. Le graphique ci-haut représente le calcul de la demi-vie de $[^{125}\text{I}]$ -BSA dans le sang. Les droites en pointillé de part et d'autre de la droite de régression linéaire représentent l'erreur expérimentale.